



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**KRYSTALIZACE MIKROBIÁLNÍCH POLYESTERŮ –
METODY STUDIA, BIOLOGICKÉ KONSEKVENCE**

CRYSTALLIZATION OF MICROBIAL POLYESTERS - METHODS AND BIOLOGICAL CONSEQUENCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jan Liczka

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1389/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Jan Liczka**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Krystalizace mikrobiálních polyesterů – metody studia, biologické konsekvence

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
2. Na základě literární rešerše zvolit a otestovat vhodné metody přípravy amorfni formy mikrobiálních polyesterů.
3. Navrhnout a realizovat modelový experiment pro studium kinetiky krystalizace připravených forem polyesterů.
4. Zhodnotit využitelnost navržené experimentální metodiky při diskusi biologických důsledků krystalizace mikrobiálních polyesterů in-vivo.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Jan Liczka
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo otestovat vhodné metody přípravy amorfnní formy mikrobiálních polyesterů a realizovat modelový experiment pro studium kinetiky krystalizace připravených forem polyesterů. V teoretické části je zpracována charakteristika PHA a různé metody izolace PHB granulí z bakteriálních buněk. V experimentální části byly nejprve otestovány měřicí techniky jako analytická centrifugace, dynamický rozptyl světla (DLS) a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) sloužící k charakterizaci vlastností PHB granulí. Dále byl proveden experiment o izolaci nativních PHB granulí z bakterií *Cupriavidus necator* pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a rozrušením buněk ultrazvukem. Výsledky analýz ukázaly, že granule jsou buďto izolovány amorfnní jen za mokra a po vysušení krystalizují, nebo že byly granule zcela amorfnní, ale nedošlo k jejich dokonalé izolaci z bakteriální buňky.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to test suitable methods for preparation of amorphous form of microbial polyesters and to perform model experiment to study a kinetics of crystallization of prepared polyesters. The theoretical part deals with PHA characteristics and various methods of isolating PHB granules from bacterial cells. In the experimental part, measuring techniques such as analytical centrifugation, dynamic light scattering (DLS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were tested to characterize the properties of PHB granules. Furthermore, an experiment was performed to isolate native PHB granules from *Cupriavidus necator* using lysozyme, deoxyribonuclease and cell disruption by ultrasonification. The results of the analyzes showed that the granules were either isolated amorphous only in the wet and crystallized upon drying, or that the granules were completely amorphous but not isolated from the bacterial cell.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát, *Cupriavidus necator*, izolace granulí, krystalinita, analytická centrifugace, infračervená spektroskopie, dynamický rozptyl světla

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, *Cupriavidus necator*, granule isolation, crystallinity, analytical centrifugation, infrared spectroscopy, dynamic light scattering

LICZKA, Jan. Krystalizace mikrobiálních polyesterů – metody studia, biologické konsekvence. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2019. 56 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, PhD.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych upřímně poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Petru Sedláčkovi, PhD. za odborné vedení, vstřícný přístup, ochotu, čas a cenné rady potřebné pro vypracování bakalářské práce. Velké poděkování patří mé konzultantce Ing. Evě Slaninové za pomoc s laboratorními experimenty, pozitivní postoj, užitečné rady během měření, a hlavně neutuchající trpělivost. Dále bych rád poděkoval Ing. Andree Kargerové, PhD. za pomoc s realizací experimentů. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

OBSAH

1 Úvod	7
2 Teoretická část	8
2.1 Bakteriální kmen – <i>Cupriavidus necator</i>	8
2.2 Polyhydroxyalkanoáty	9
2.2.1 Základní charakteristika	9
2.2.2 Biosyntéza	11
2.3 Krystalizace	13
2.3.1 Krystalizace polymerů	14
2.3.2 Krystalizace polyhydroxyalkanoátů	15
2.4 Metody izolace	15
2.4.1 Extrakční izolace	16
2.4.2 Chemická digesce buněčných komponent	17
2.4.3 Mechanická izolace	18
3 Současný stav řešené problematiky	19
4 Experimentální část	21
4.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje	21
4.1.1 Použité bakterie	21
4.1.2 Použité chemikálie	21
4.1.3 Použité přístroje	21
4.2 Kultivace	21
4.2.1 Příprava inokula	21
4.2.2 Živná média	22
4.3 Příprava roztoků	23
4.3.1 Příprava tris-HCl pufru	23
4.3.2 Příprava PBS pufru	23
4.4 Postup izolace PHB	23
4.4.1 Postup izolace PHB s gradientovou centrifugací	23
4.5 Vizualizace granulí pomocí fluorescenční mikroskopie	24
4.5.1 Barvení Nilskou červení	24
4.5.2 Barvení BODIPY	24
5 Výsledky a diskuze	25
5.1 Optimalizace měřících technik	25
5.1.1 Analytická odstředivka (Lumisizer)	25

5.1.2	Dynamický rozptyl světla (DLS)	27
5.1.3	Infračervená spektroskopie	29
5.2	Izolace nativních PHB granulí.....	30
5.2.1	Izolace PHB	30
5.2.2	Vliv amplitudy ultrasonifikace na krystalizaci polymeru	33
5.3	Optimalizace vybraných izolačních kroků nativních PHB granulí	36
5.3.1	Časová řada 75% amplitudy	36
5.3.2	Izolace za použití gradientové centrifugace.....	40
6	Závěr	43
7	Seznam použité literatury	44
8	Seznam použitých zkratk	48
9	Přílohy.....	49

1 ÚVOD

V dnešní době je velmi moderní myslet na přírodu a její ochranu, z tohoto důvodu stále více a více rostou tendence vývoje materiálů, které by byly schopny plnohodnotně nahradit látky, jež se vyrábí v petrochemickém průmyslu. Jednou skupinou takových látek jsou také bioplasty, neboli biodegradabilní polymery založené na přírodních zdrojích.

Mezi bioplasty patří také polyhydroxyalkanoáty (PHA), zejména pak polyhydroxybutyrát (PHB), což jsou v přírodě široce se vyskytující zásobní polymery, které se svými vlastnostmi velmi podobají syntetickým plastům, například polypropylenu či polyetyleny. Narozdíl od nich je PHB degradabilní, což znamená, že se v přírodním prostředí v poměrně krátkém časovém horizontu zcela rozloží a nemusí se řešit problém s jeho odpadem.

PHB je polyester který se v posledním třicetiletí těší poměrně velkému zájmu široké vědecké komunity zabývající se vývojem biologicky rozložitelných polymerů. Kromě samotné produkce se zkoumala struktura, vlastnosti a izolace tohoto polymeru. Zásadním tématem je také využití PHB, protože jeho potenciál je obrovský. Jedním z hlavních problémů PHB ve vztahu k jeho potenciálním aplikacím je jeho krystalinita. Krystalizace PHB zhoršuje vlastnosti polymeru a činí ho hůře zpracovatelným. Proto je důležité nalézt vhodnou metodu izolace, která by zajistila získání polymeru v nativním amorfním stavu. Izolace nativních amorfních granulí z buněk mikrobiálních producentů PHB je zároveň nezbytným krokem, který by umožnil systematické studium přirozených mechanismů, které udržují PHB v těchto granulích v amorfní formě a brání jeho samovolné krystalizaci. Z tohoto důvodu se tato bakalářská práce věnuje optimalizaci postupu izolace granulí PHB z buněk modelového producenta PHB, kterým je bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16.

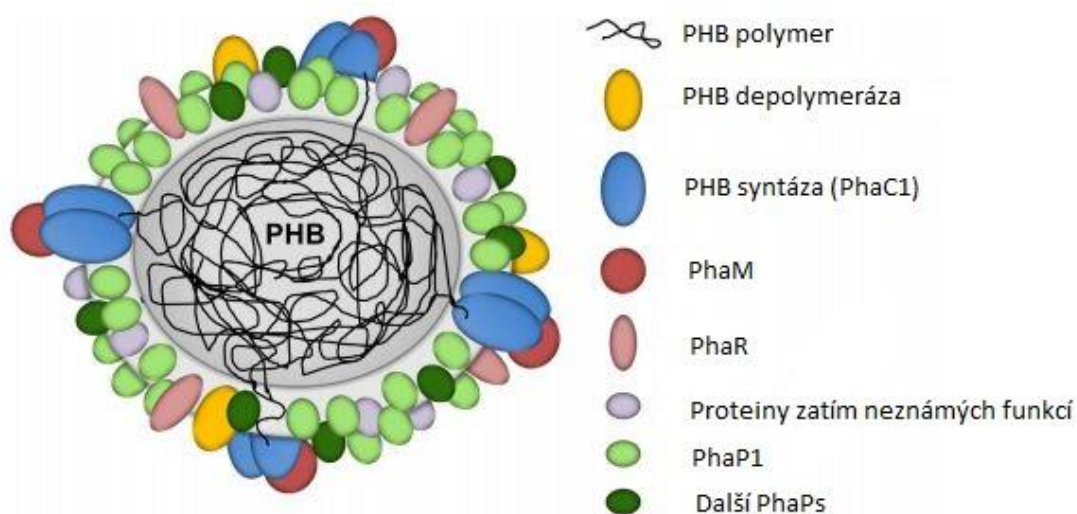
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakteriální kmen – *Cupriavidus necator*

Mikroorganismus *Cupriavidus necator* je také známý pod staršími názvy *Ralstonia eutropha* a *Wautersia eutropha*. Jedná se o fakultativně chemolitoautotrofní, gramnegativní bakterii, která netvoří spory. *C. necator* H16 se v běžné přírodě vyskytuje ve sladké vodě či v půdě, ze kterých čerpá organické sloučeniny nebo H_2 a CO_2 jako zdroj energie a uhlíku. Při absenci O_2 může také růst anaerobně za použití denitrifikace jako jediného zdroje energie a uhlíku [1].

Cupriavidus necator je jedna z nejlépe prostudovaných bakterií, proto také slouží jako modelový mikroorganismus pro genetiku a kontrolu autotrofní fixace oxidu uhličitého a oxidace vodíku. Jedná se také o bakterii produkující velké množství polyhydroxybutyrátu (PHB) v případě nevyvážených růstových podmínek (nedostatek N, P, S a dalších, nadbytku uhlíku). Tyto polymery jsou tvořeny bakteriálním kmenem ve formě intracelulárních granulí, kdy velikost a množství granulí PHB závisí na kultivačních podmínkách a druhu bakteriálního kmenu. Konkrétně pro *Cupriavidus necator* činí obsah PHB v buňce přibližně 80 hmotnostních %. Vzhledem k svým vlastnostem může být buňka v budoucí biotechnologii použita pro výrobu různých komerčně hodnotných sloučenin, jako jsou například metabolity a již zmíněné polymery. Tato bakterie byla intenzivně studována také na potenciální tvorbu kopolymeru, který nabízí širší rozsah vlastností scl-PHA (viz níže) [1, 2].

Nejnovější studie prokazují, že PHB granule v bakteriální buňce *C. necator* neobsahují v povrchové vrstvě fosfolipidy, jak bylo dříve předpokládáno, nýbrž se sestává pouze z proteinů, které jsou zodpovědné za syntézu a degradaci PHB a tvorbu granulí. PHB syntáza je klíčovým enzymem katalyzujícím polymeraci (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. PHB depolymeráza je zase zodpovědná za degradaci amorfního PHB v granulích po vyčerpání zdroje energie z kultivačního média. Ostatní proteiny slouží zejména jako strukturní materiál. Jsou tvořeny hydrofobní částí orientovanou do středu granulí a hydrofilní částí orientovanou do cytoplazmy. Mimo tyto proteiny je v jádru PHB granulí obsaženo i malé množství vody, která funguje jako plastifikátor, a tudíž přispívá k udržování PHB v amorfním stavu. Model PHB granule v bakteriální buňce *C. necator* je ilustrován na obrázku 1[3].



Obrázek 1: Model *in vivo* PHB granule v *C. necator* H16 [3].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou ústřední látkou mikroorganismu sloužící pro přežití stresové situace. PHA podporuje dlouhodobé přežívání bakterií za nedostatku živin tím, že působí jako zásobárna uhlíku a energie pro nesporeující i pro sporeující bakterie. Navíc bakterie obsahující PHA vykazují zvýšenou odolnost vůči stresu způsobenému různými vnějšími vlivy, jako je například ultrafialové (UV) záření, teplo, osmotický šok a jiné. Do rozsáhlé skupiny PHA patří zejména polyhydroxybutyrát (PHB) [4].

2.2.1 Základní charakteristika

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou skupina přirozeně se vyskytujících biopolyesterů 2-, 3-, 4-, 5-, 6- hydroxyalkanových kyselin patřící mezi biologicky degradovatelné polymery. Výskyt PHA je již potvrzen u více než 90 rodů gram-pozitivních i gram-negativních bakterií. Díky jejich biokompatibilitě a biodegradabilitě se hojně využívají v různých průmyslových odvětvích. Jejich největší klad je v tom, že představují obnovitelný zdroj bioplastu, který nepředstavuje jakoukoliv zátěž pro životní prostředí [4, 5].

Jak už bylo zmíněno výše PHA bývá uložena uvnitř buňky, konkrétně v buněčné cytoplasmě, kde slouží jako zásobní látka zdroje energie a uhlíku pro případ zhoršení podmínek. Ukládají se ve formě granulí, které jsou obaleny vrstvou proteinů. PHA molekula je typicky tvořena 600 až 35000 monomerních jednotek hydroxy kyselin. Každá monomerní jednotka obsahuje skupinu R postranního řetězce, která je obvykle nasycenou alkylovou skupinou, ale může mít také formu nenasycených alkylových skupin, rozvětvených alkylových skupin a velmi vzácně i substituovaných alkylových skupin. V závislosti na počtu atomů uhlíků v monomeru PHA lze polyhydroxyalkanoáty rozdělit do tří základních skupin. Na skupiny s krátkým řetězcem (*short – chain lenght* PHA, scl-PHA), se středně dlouhým řetězcem (*medium – chain lenght* PHA, mcl-PHA) a na PHA s dlouhým řetězcem (*long – chain lenght*, lcl-PHA), kde scl-PHA obsahuje monomer o 3–5 atomech uhlíku, mcl-PHA má 6–14 uhlíků v monomeru a skupina

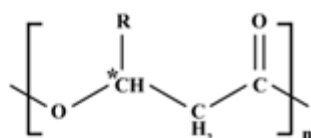
lcl-PHA se skládá z monomeru o velikosti 15 a více atomů uhlíku. Strukturu PHA lze vidět na Obrázek 2 [5, 6, 7].

Doposud bylo popsáno přibližně 150 monomerních jednotek, které mohou tvořit PHA a tento počet se stále zvyšuje se zaváděním nových typů PHA chemickou nebo fyzikální modifikací přirozeně se vyskytujících PHA nebo vytvořením geneticky modifikovaných organismů. Díky této rozmanitosti je umožněno biotechnologicky vyrábět PHA s různorodými vlastnostmi. Konkrétní typ vznikajícího PHA závisí především na použitém mikrobiálním kmenu, mediu, jeho koncentraci a popřípadě i na délce kultivace [4, 7].

Mezi nejznámější zástupce scl-polyhydroxyalkanoátů patří poly-3-hydroxybutyrát (P3HB) a poly-4-hydroxybutyrát (P4HB), ale také kopolymery například poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) – P(3HB-co-3HV) neboli zkráceně P3HBV. Z hlediska vlastností jsou P(3HB) a P3HBV oba krystalické polymery (P3HB 70% krystalinita, P3HBV 60% krystalinita), shodují se také v křehkosti a tvrdosti, mají vysokou teplotu tání (53 – 80 °C). Liší se teplotou skelného přechodu, kde kopolymer má velmi nízkou teplotu -144 °C, kdežto P3HB má skelný přechod při 4 °C, což je aplikačně velmi zajímavé a podporuje to snahu produkovat kopolymery. Dále pak polymer P(4HB) je silný flexibilní termoplastický polyester s relativně jednoduchou strukturou. Všechny scl-PHA mají vyšší pevnost v tahu než konvenční plasty založené na petrochemii jako jsou polypropylen a polystyren [5].

Naproti tomu mcl-PHA, jako je například polyhydroxyoktanoát, vykazují vlastnosti elastomerů s nízkým stupněm krystalinity a se špatnou pevností v tahu, ale s velkým prodloužením do přetržení. Tato skupina PHA se značí nižší teplotou tání (cca. 30 – 80 °C) a teplotu skelného přechodu (-40 – 150 °C). Na rozdíl od polymerů složených pouze z scl nebo mcl monomerní jednotky, scl-mcl-PHA kopolymery mají vynikající fyzikální, tepelné a mechanické vlastnosti podobné polyethylenu, nebo polypropylenu, v závislosti na poměru scl a mcl monomerních jednotek [5, 6].

Lcl-polyhydroxyalkanoáty zatím nejsou dostatečně prostudovanou skupinou. Kultura *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC) 7925 je momentálně jednou z dosud málo publikovaných organismů schopných akumulovat nový scl-lcl-PHA kopolymer sestávající se z jednotek scl 3HA, konkrétně 3HB a 3-hydroxyvalerátu (3HV), a lcl 3HA jednotek, 3-hydroxyhexadekanoátu (3HHD) a 3-hydroxyoktadekanoátu (3HOD). Vlastnosti kopolymeru ještě nejsou zcela objasněny [6].



Poly(3-hydroxyalkanoát)

R skupina	počet uhlíků	PHA polymer
methyl	C ₄	Poly(3-hydroxybutyrát)
ethyl	C ₅	Poly(3-hydroxyvalerát)
propyl	C ₆	Poly(3-hydroxyhexanoát)
butyl	C ₇	Poly(3-hydroxyheptanoát)
pentyl	C ₈	Poly(3-hydroxyoktanoát)
hexyl	C ₉	Poly(3-hydroxynonanoát)
heptyl	C ₁₀	Poly(3-hydroxydekanoát)
octyl	C ₁₁	Poly(3-hydroxyundekanoát)
nonyl	C ₁₂	Poly(3-hydroxydodekanoát)
decyl	C ₁₃	Poly(3-hydroxytridekanoát)
undecyl	C ₁₄	Poly(3-hydroxytetradekanoát)
dodecyl	C ₁₅	Poly(3-hydroxypentadekanoát)
tridecyl	C ₁₆	Poly(3-hydroxyhexadekanoát)

Obrázek 2: Chemická struktura polyhydroxyalkanoátu a nomenklatura jednotlivých PHA sloučenin [4].

Obecně lze shrnout, že PHA jsou opticky aktivní polyestery, nerozpustné ve vodě, které vykazují vysoký stupeň polymerace. Jejich vlastnosti mohou být zlepšeny prostřednictvím využití kopolymerů, modifikací povrchu nebo kombinací s jinými anorganickými materiály. V průmyslu se biopolymery díky svým vlastnostem používaly nejprve k výrobě biologicky rozložitelných, obalových materiálů, dále pro výrobu náterových hmot a v neposlední řadě jsou polyhydroxyalkanoáty využívány v rámci medicínských aplikací, a to jako kardiovaskulární produkty, nosiče léků nebo jako proléčiva (prekursory léčiv) [4, 7].

2.2.2 Biosyntéza

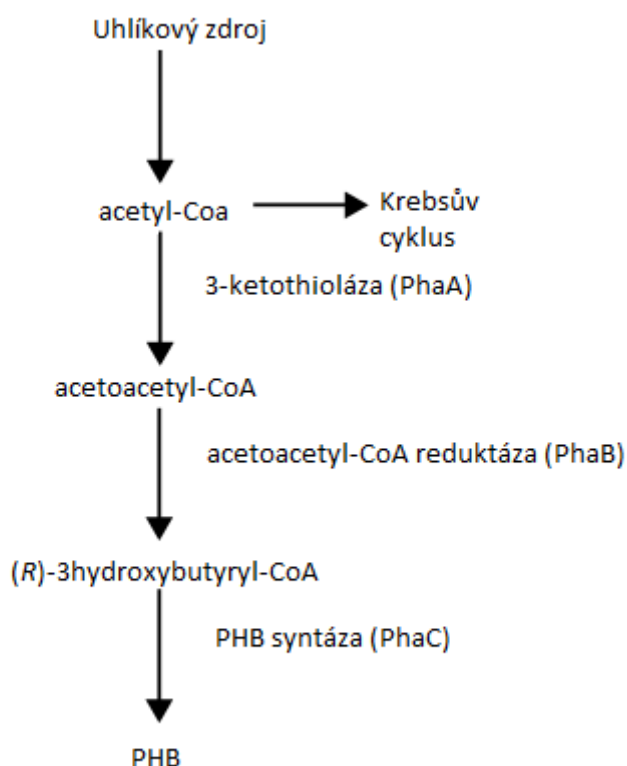
Biosyntetické dráhy PHA jsou spojeny s centrálními metabolickými drahami bakterií, včetně glykolýzy, Krebsova cyklu, β -oxidace, syntézy mastných kyselin, katabolismu aminokyselin, Calvinova cyklu a serinové dráhy [4].

Jak už bylo popsáno výše, existuje více typů PHA, a o tom, jaký typ PHA produkuje daný mikroorganismus, rozhoduje substrát sloužící jako zdroj uhlíku a substrátová specifita PHA syntázy. Většina mikroorganismů využívá pro produkci PHA biosyntetickou dráhu, při které se acetyl-CoA, vzniklý katabolismem cukrů, acetátu či pyruvátu, převádí na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA, který následně kondenzuje působením PHA syntázy. U některých organismů se místo (R)-izomerů generují (S)-izomery 3-hydroxybutyryl-CoA. Vzhledem k tomu, že PHA syntáza je stereospecifická, konkrétně aktivní pouze pro (R)-izomery, musí polymeraci předcházet reakce vedoucí k přeměně (S)-izomerů na (R)-izomery. Tyto přeměny jsou u řady mikroorganismů katalyzované enoyl-CoA hydrázami. Pokud jsou substrátem pro růst a produkci PHA oleje, dochází po hydrolýze olejů nejprve k β – oxidaci mastných kyselin a jako výchozí látky pro syntézu P(3HB) jsou využívány acetyl-CoA nebo acetoacetyl-CoA [8].

Pokud jsou jako zdroj uhlíku použity oleje dochází nejprve k β – oxidaci mastných kyselin a substrátem pro syntézu PHB je právě acetyl-CoA nebo acetoacetyl-CoA [8].

Jako první byl ze skupiny PHA objevený PHB, a proto je také nejvíce prostudovaný. Zároveň je produkce PHB velmi dobře popsána právě u bakteriálního kmene *C. necator*. PHB je v těchto bakteriích produkován jako vedlejší produkt metabolismu [8].

V prvním kroku metabolické dráhy scl-PHA, enzym 3-ketothioláza (PhaA) katalyzuje reakci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Prostřednictvím dalšího enzymu acetoacetyl-CoA reduktázy (PhaB) dochází k redukci acetoacetyl-CoA za přítomnosti NADH na 3-hydroxybutyryl-CoA. A následně PHB syntáza (PhaC) polymeruje 3-hydroxybutyryl-CoA na PHB, přičemž je uvolňován koenzym. Pouze (R)-izomery jsou akceptovány jako substráty pro polymerizující enzym, z důvodu již zmíněné stereospecifity PHB syntázy. Jednoduché znázornění této metabolické dráhy lze pozorovat na obrázku 3 [4, 8].



Obrázek 3: Metabolická dráha PHB [8].

Jedna z nejčastějších regulací metabolické dráhy PHA se odehrává v závislosti na nutričních podmínkách. Jestliže se bakteriální kmen například *Cupriavidus necator* vyskytuje v prostředí bohatém na živiny, produkce vysokého množství koenzymu A z Krebsova cyklu blokuje syntézu PHA inhibicí 3-ketothiolázy (Pha) tak, že acetyl-CoA je nasměrován do Krebsova cyklu pro produkci energie a pro růst buněk. Naopak při nevyvážených nutričních podmínkách (například když nezbytná živina, jako je dusík a fosfor, omezuje přítomnost přebytkového

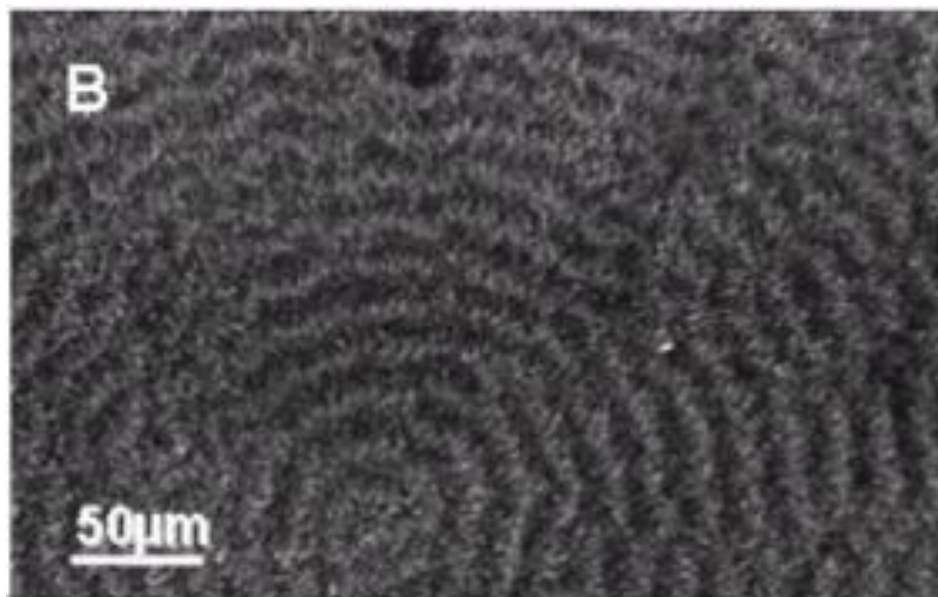
uhlíku), jsou hladiny koenzymu A neinhibující, což umožňuje acetyl-CoA směřovat k PHA syntetickým cestám pro akumulaci PHA [4, 8].

2.3 Krystalizace

V kontextu biopolymerů je krystalizace běžná a užitečná laboratorní technika. Může být použita k čištění látek a může být kombinována s pokročilými zobrazovacími metodami, aby bylo možné pochopit podstatu krystalizovaných látek [10].

Krystalizace je přirozený proces, ke kterému dochází, když materiály přechází z kapalné fáze do pevné, nebo se vysrážejí z kapalné fáze či plynné. To může být způsobeno fyzikální změnou, jako je například změna teploty, nebo chemickou změnou, jako je například nízké pH. Krystalizace je proces řízený velikostí a tvary zúčastněných molekul a jejich chemickými vlastnostmi. Krystaly mohou být tvořeny z jediného druhu atomu, různých druhů iontů anebo dokonce velkých molekul, jako jsou proteiny. Některé velké molekuly mají delší dobu krystalizačního procesu, protože jejich vnitřní struktura není příliš symetrická nebo interaguje sama se sebou, aby se zabránilo krystalizaci [9, 10].

Základním krokem v procesu krystalizace je nukleace, kdy první atomy v hmotě tvořící krystalovou strukturu (nukleační jádro) se stávají středem a kolem tohoto jádra se organizuje více atomů, což lze vidět na obrázku 4. Když tato situace nastane, kolem jádra se organizuje více a více atomů, což vede k vytvoření malého semenného krystalu. Proces nukleace je mimořádně důležitý při krystalizaci, jádro krystalu bude určovat strukturu celého krystalu. Nedokonalosti v jádře a krystalu semen mohou vést k drastickým přestavbám, zatímco se krystal dále utváří. Nukleace se děje v podchlazené kapalině nebo supersaturovaném rozpouštědle, ale samozřejmě hodně záleží na teplotě a s tím související rozpustnosti [10].



Obrázek 4: Snímek zkrystalizovaného PHB [11].

2.3.1 Krystalizace polymerů

U polymerních látek se z morfologického hlediska rozlišují dva stavy, a to amorfní a krystalický, které se výrazně liší svými vlastnostmi. Pro průmyslové zpracování je výhodnější stav amorfní [12].

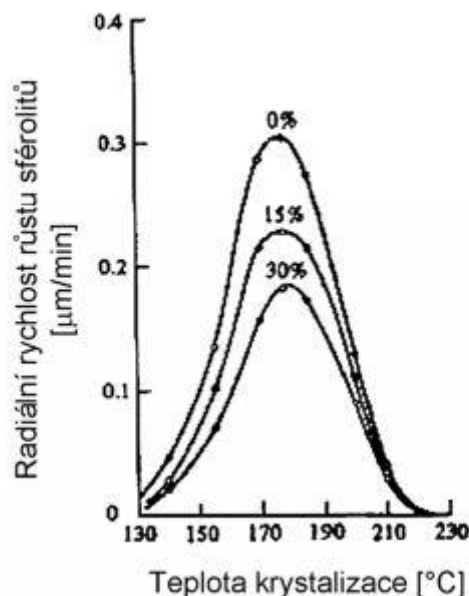
Amorfní stav se vyznačuje velmi neuspořádanou konformací řetězců, které z energetických důvodů vytvářejí statická klubka. Pokud takovou látku vystavíme vyšším teplotám, začne docházet ke vzniku tavenin, ve kterých působí mechanické napětí. Toto napětí může klubka rozmotávat a do určité míry řetězce napřimovat, což vede ke ztrátě struktury [12].

Krystalický stav je naopak případ látek, které jsou schopny určitého napřímění řetězců a jejich pravidelného ukládání do prostoru. Nejčastějším krystalickým útvarem pro polymery jsou sférolity, které vznikají z taveniny při krystalizaci. Sférolity vznikají z monokrystalů, jejichž struktura, počet a rychlost vzniku řídí supramolekulární strukturu a tím i vlastnosti polymeru. Nejdůležitějšími aspekty procesu jsou teplota samotné krystalizace a rychlost chlazení [12].

- Krystalizace se obecně dělí na izotermní a neizotermní.

Za izotermních podmínek rostou vzniklé zárodky nukleačních jader ve všech směrech rovnoměrně a mají v rámci možností srovnatelné rozměry. Vzniká tak radiální kulovitý sférolit, při jehož růstu dochází k větvení nebo ohybu lamel pod úhlem charakteristickým pro každý polymer. Jak už bylo popsáno výše, krystalizace je velmi závislá na teplotě, a tudíž, když se krystalizační teplota pohybuje kolem teploty tání polymeru, dochází k pomalému růstu malého množství sférolitů, které dosahují velkých rozměrů. Krystalizační teplota určuje dobu, za kterou zárodky vzniknou a také jejich koncentraci. Podobně jako teplota působí na monokrystaly také přítomnost nukleačních činidel. Za izotermních podmínek roste poloměr sférolitu s časem lineárně. Závislost rychlosti růstu sférolitu na teplotě popisuje křivka (zvonová křivka), jejíž maximum leží uprostřed mezi teplotou skelného přechodu a rovnovážnou teplotou tání (viz obrázek 5). Růst sférolitu je spouštěn dvěma mechanismy, podchlazením a difúzí krystalizujícího materiálu k povrchu sférolitu [13].

Oproti tomu za neizotermických podmínek preferují vzniklé zárodky růst lamel ve směru jeho délky, větví se a vytváří snopec, který se rozšiřuje až dojde k jeho uzavření. Vzniká sférolit s chomáčkovitou strukturou nazývanou dendritický sférolit nebo dendrit [13].



Obrázek 5: Zvonová křivka rychlosti růstu sférolitů [13].

2.3.2 Krystalizace polyhydroxyalkanoátů

V rámci krystalinity se PHA vyskytují v široké škále stavů od nekystalických až po vysoce krystalické formy s hodnotami krystalinity mezi 0 % a 70 %. Krystalizace PHB je spojena se vznikem velkých sférolitů, které rostou velmi pomalou krystalizační rychlostí. Vykrytalizovaný PHB tak má vysokou krystalinitu, nízkou houževnatost a pevnost. Z hlediska průmyslové technologie je celý krystalizační cyklus PHB neefektivní a pomalý. Důležitý je také fakt, že dochází i k postkrystalizaci, během které vznikají na povrchu materiálu nepravidelné trhliny, které ještě snižují houževnatost a zvyšují křehkost [14, 15, 16].

Velká část odborníků a výzkumných skupin se zabývá úpravou uvedených vlastností, která vede přes modifikaci chemické, molekulární a supramolekulární struktury. Způsoby, kterými lze dosáhnout požadovaných vlastností v závislosti na finální aplikaci jsou například kopolymerace s jinými, houževnatějšími polymery, přidáváním aditiv nebo nukleačních činidel, popřípadě také míchání s termoplastickými polymery [15, 16].

Výsledky studií ukazují, že PHB se v granulích vyskytují v amorfním stavu a jsou náchylné k hydrolýze intracelulárními PHB depolymerázami. Pokud však dojde v PHB granulích k chemickému, biochemickému nebo fyzikálnímu stresu, stanou se tyto granule odolnými vůči působení PHB depolymeráz a začne se projevovat krystalizace v polymerním řetězci. Jak už bylo popsáno výše, krystalizace velmi ovlivňuje vlastnosti PHB, a proto je snaha o izolaci PHB v amorfní formě [17].

2.4 Metody izolace

Izolace polyhydroxyalkanoátů z bakteriální buňky je nezbytným krokem k získání surového PHA. Samotná izolace významně ovlivňuje náklady na celkovou produkci a pozdější zpracování PHA. Cílem řady vědců bylo a je nalézt vhodnou metodu izolace. Takovou, aby získaný polymer mohl finančně konkurovat petrochemickým plastům a zároveň aby byla

izolace šetrná k životnímu prostředí. Cílem izolace je také získat vysoce čistý polymer, který splňuje chemické i fyzikální požadavky pro další použití. Během řady let bylo vyvinuto velké množství postupů, které lze rozdělit do několika skupin – extrakční izolace, enzymatická izolace, mechanická izolace a další. Vedle izolace čistého polymeru byla také v posledních letech vyvinuta řada izolačních technik, jejichž cílem je izolovat z buňky intaktní granule v nativním stavu. Těmto postupům se bude věnovat kapitola 3 [17].

2.4.1 Extrakční izolace

Použití organického rozpouštědla k izolaci PHA je jedna z nejstarších metod izolace. Tato metoda je založena na rozpustnosti PHA v organickém rozpouštědle, zatímco zbylé buněčné komponenty zůstávají nerozpuštěny a velmi často bývají odstraněny z roztoku PHA běžnou filtrací [18].

V prvním kroku mechanismu působení rozpouštědla je modifikovaná permeabilita buněčné membrány a až ve druhém kroku dochází k rozpuštění PHA. Následná separace PHA z rozpouštědla se provádí buď odpařením rozpouštědla, nebo srážením v roztocích, které PHA nerozpouští [18].

Mezi prvními testovanými rozpouštědly byly pyridin, chloroform, či jiná rozpouštědla, která obsahují chlorované uhlovodíky (dichlorethan, trichlorethan, tetrachlorethan) nebo jejich azeotropické směsi (1,1,2-trichlorethan s vodou), popřípadě další směsi s chloroformem. V pozdějších letech se z ekologických a bezpečnostních důvodů začaly objevovat také nechlorovaná rozpouštědla, jako je například ethylenkarbonát a propylenkarbonát. Je možné použít i směs více rozpouštědel [18, 19].

Extrakce se také velmi liší v závislosti na délce řetězce PHA. Již zmíněná rozpouštědla na bázi chlorovaných uhlovodíků (např. chloroform, či dichlorethan) jsou vhodná pro rozpouštění scl-PHA, kdežto mnohem méně náročné mcl-PHA jsou rozpustné v širším spektru chemikálií, například nižší ketony, nižší alkoholy, ale třeba také toluen. Tato rozpouštědla jsou zpravidla levnější, a hlavně méně toxická [20].

Extrakce PHA z bakterie *C. necator* byla mnohokrát zkoumána. Zjistilo se, že nejlepší výsledky byly získány pro rozpouštědla, ve kterých funkční atomy uhlíku nesou alespoň jeden atom chloru a jeden atom vodíku. Například za použití diolu (1,2-propandiol) vede k 79% výtěžku s čistotou přesahující 99 % [18].

Avšak použití rozpouštědel ničí přirozenou morfologii granulí PHA, která je užitečná v určitých aplikacích, jako je například výroba silných vláken. Ale na rozdíl od některých jiných způsobů izolace, extrakce rozpouštědlem nedegraduje polymer a může být proto použita pro jiné vhodnější aplikace, například v lékařství. Jak již bylo zmíněno, dalším problémem spojeným s použitím rozpouštědel je to, že velká řada z nich je nebezpečná pro provozovatele a také pro samotné životní prostředí. To je také částečně důvod, proč je extrakce rozpouštědlem široce používána v laboratořích, ale s omezeným využitím ve velkoplošném zpracování. Extrakční postupy jsou však, přes své nevýhody, schopny poskytovat velmi čistý produkt se střední molární hmotností rovnající se téměř původní hodnotě, což je jejich velká výhoda ve srovnání s ostatními metodami [18].

2.4.2 Chemická digesce buněčných komponent

Chemická digesce neboli také metody založené na rozpouštění buněčných komponent netvořících PHA. Svým postupem jsou tyto metody prakticky opačné k metodám extrakčním. Jak už bylo popsáno výše v kapitole 2.4.1, u extrakcí je PHA převáděno do kapalné fáze, zatímco u digesce jde naopak o zachování polymeru v původním stavu a o rozpuštění ostatních částí buněk pomocí vhodných chemikálií. Do této metody spadá i využití enzymů [20].

2.4.2.1 Metody využívající povrchově aktivní látky

Velmi oblíbenou metodou je použití povrchově aktivních látek (PAL), jako je například aniontový dodecylsírán sodný (SDS). Tyto látky naruší buňky díky jejich inkorporaci do lipidové dvouvrstvé membrány. Čím více surfaktantu je přidáno, tím více ho vstoupí do membrány a způsobuje zvýšení objemu až do nasycení buňky. Další přídavek PAL způsobí štěpení membrány za vzniku micel povrchově aktivních látek a membránových fosfolipidů, což vede k uvolnění PHA do roztoku [18, 21].

Výhodou použití surfaktantu je, že tato látka je schopná solubilizace. To znamená, že nerozpouští pouze proteiny, ale také jiné buněčné komponenty mimo PHA. Další výhodou této metody je skutečnost, že povrchově aktivní látky lyzují buňku bez známky degradace granulí polymeru. A zároveň za použití surfaktantu není nutno provádět předběžné úpravy roztoku, tudíž je možné získávat PHA přímo z kultivačních médií [18, 21].

Naopak nevýhodou této techniky je fakt, že neposkytuje tak vysokou čistotu jako výše zmíněná extrakční metoda a také jsou potřeba další chemická činidla, jako například chlornan a hydroxid sodný. Je potřeba zmínit rovněž fakt, že je zapotřebí použít značné množství povrchově aktivní látky, což má za následek zvýšení nákladů a také problémy v odpadních vodách [18].

2.4.2.2 Metody využívající povrchově aktivní látky ve směsi

Pro izolaci PHA se rovněž využívají povrchově aktivní látky ve směsi s chelatačními činidly. Samotný mechanismus probíhá obdobně jako u již zmíněné metody využívající jen surfaktanty. Výjimka je v tom, že chelatační činidlo je schopno tvořit komplexy s ionty, které se nachází v buněčné stěně některých bakterií a destabilizovat tím vnější membránu. Tato nestabilita vede k oslabení vnitřní membrány a dochází následně k lyzi samotné buňky. Použitím chelatačního činidla se dá významně zvýšit čistota získaného polymeru, přičemž nedochází k vážnému poškození životního prostředí, avšak je zde problém s velkým množstvím odpadní vody. Tento nedostatek byl vyřešen zavedením cyklu opětovného použití odpadní vody s příměsí malého množství surfaktantu a chelatačního činidla. Toho se využívá do doby, než dojde k poklesu čistoty získávaného polymeru pod 96 %. Následně dochází k pročištění vody přídavkem kyseliny chlorovodíkové a aktivního uhlí [22].

2.4.2.3 Enzymatická izolace

Další možností izolace PHA je využití enzymů. Metoda využívající enzymatického štěpení enzymů, byla vyvinuta jako alternativa k extrakční izolaci. Při izolaci je využíváno proteolytických enzymů, které vynikají svou schopností štěpit vazby mezi jednotlivými aminokyselinami buněčné membrány a rozrušit tak obalovou vrstvu PHA a zároveň mají jen malé degradační účinky vůči PHA [18].

Na podporu popsané metody byla provedena studie, jejíž cílem byla izolace PHA z bakterie *C. necator* DSM 545, ve které byly použity enzymy trypsin, bromelain a lysozym, jež vykazují vysokou proteolytickou aktivitu k dané bakterii. Nejlepší výsledky ze studie byly získány za použití enzymu bromelainu, a to konkrétně 2%. Čistota výsledného PHA činila 88,8 %, což zaostává oproti ostatním metodám. Ve studii byl použit také pankreatin. Avšak jeho použití vedlo sice ke zvýšení čistoty, ale na úkor ztráty procentuální výtěžnosti [22].

Byla také publikována studie, která pojednává o kombinované metodě zahrnující alkalázu a SDS. Cílem metody je získat PHA z biomasy bakterie *Pseudomonas*. Postup zahrnuje tepelnou denaturaci biomasy, po níž následuje přidavek nadbytku enzymu a SDS za spoluúčasti EDTA. SDS se váže na povrch granulí, čímž zabraňuje znovunavázání agregátů vzniklých z rozrušené biomasy. Výsledkem je polymer o čistotě 95 %. Nevýhodou metody však je, že SDS snižuje čistotu polymeru [23].

2.4.3 Mechanická izolace

Mechanické narušení buněk je široce používáno pro oslabení intracelulárních proteinů. Tento způsob se v základu dělí na dvě hlavní kategorie. První kategorie představuje metody, ve kterých dochází ke kontaktu buněk s pevnými překážkami. Mezi tyto metody patří například kuličkové mlýny. U druhé kategorie se jedná o metody, kde je využíváno rozdílnosti tlaků, jako například při vysokotlaké homogenizaci nebo ultrasonifikaci [18].

Kuličkový mlýnek se skládá z vertikální válcové mlecí komory mající soustředěný válec s rotorem s proměnnou rychlostí pro míchání. Buněčné suspenze vstupují do mlýnku na jeho základně a protékají nahoru do prstencového otvoru mezi rotorem a statorem a opouštějí mlýnek v blízkosti vrcholu. Samotný provoz mlýnku generuje teplo, které je odstraněno chladícím aparátem. Výhodou kuličkového mlýnku je fakt, že samotné narušení je nezávislé na koncentraci biomasy [18].

Použití vysokotlaké homogenizace je jednou z nejznámějších metod pro rozrušení buněk ve velkém měřítku. Zařízení se skládá ze vzduchem poháněného čerpadla, které převádí buněčnou suspenzi přes dvě paralelní štěrby pod vysokým tlakem. Narušení nastává při teplotě okolí, což je udržováno chladícím aparátem. Výkon homogenizátoru závisí na koncentraci biomasy. Využitím vysokotlakého homogenizátoru v přítomnosti SDS byl získán PHA z *Methylbacterie* sp. V49 maximální výtěžek 98 % s 95% čistotou [18].

Další metoda využívá kombinace centrifugace a ultrasonifikace, kdy je suspenze s přídavkem enzymů nejprve několikrát odstředěna a následně vystavena ultrazvuku. Ultrazvuk vyvolá v roztoku podtlak, který způsobí, že se buňka rozpadne [24].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V současné době se v biotechnologickém průmyslu klade velký důraz na zdokonalení vlastností polyhydroxyalkanoátů, a to zejména z důvodu jejich možného využití jako biologicky rozložitelného materiálu, který může konkurovat výrobkům z petrochemického průmyslu. Závažným problémem při zpracovávání PHA je jeho krystalizace, ke které často dochází při izolaci PHA z bakteriálních buněk. Přitom nativní PHA granule se nacházejí v amorfní formě, která vykazuje podstatně vyšší elasticitu a flexibilitu ve srovnání s krystalicky izolovanými čistými polymery. Cílem mnoha experimentů se tudíž stalo studium mechanismů, které zabráňují krystalizaci PHA v buněčných granulích, a tedy i metody izolace těchto granulí v nativním stavu [17].

Toto téma bylo v minulosti již považováno za zcela vyřešené, jelikož existuje spousta protokolů, při kterých se dle autorů podařilo extrahovat amorfní PHA. Nicméně z nejnovějších studií vyplývá, že takto vyextrahované PHA polymery mohou být zpočátku amorfní, ale po vysušení dochází ke krystalizaci. A proto dochází v dnešní době k návratu ke kořenům a k opětovným pokusům o úspěšnou izolaci PHA v amorfním stavu [17].

Jak už bylo řečeno v kapitole 2.2, bakterie obsahující PHA vykazují zvýšenou odolnost vůči stresu. Amorfní stav PHA granulí přímo souvisí s tímto obraným mechanismem bakterií. Touto problematikou se zabývala studie *P. Sedláčka a spol. (2019)*. Zaměřila se na otázku, jaký typ a rozsah počátečního stresu přijatého na buňkách ovlivňuje inicializaci a průběh procesu krystalizace, a mimo to experiment také přispěl k objasnění mechanismu udržujícího granule v termodynamicky nestabilním amorfním stavu. Využitím technik infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) se prokázalo, že buňky *C. necator* H16 po vyschnutí krystalizují. Jinými slovy, bylo prokázáno, že pro vyvolání krystalizace musí být buněčná kultura nejprve vystavena nepříznivým podmínkám následovaným vysušením buněk. Studie dále ukázala, že pouze stresové faktory, které vedly ke koalescenci PHA granulí, indukují krystalizaci polymeru. Experimentálně bylo v této práci potvrzeno, že amorfní stav polymeru je stabilizován nízkou rychlostí krystalizace v malém objemu malých PHA granulí a voda přítomná v granulích PHA funguje jako plastifikátor neboli změkčovadlo chránící polymer před krystalizací [17].

Také další práce *Y. Kawaguchiho a Y. Doi (1990)* měla za cíl izolovat nativní PHB granule z bakterie *Cupriavidus necator* a studium krystalizace získaného polymeru. Izolace probíhala pomocí enzymů, konkrétně lysozymu a deoxyribonukleázy. Dále byla použita centrifugace a následné ultrasonifikace. Izolace granulí byla doprovázena ošetřením různými roztoky (roztok acetonu, chlornanu sodného a hydroxidu sodného), popřípadě dalšími enzymy (trypsin, lipáza). Studie prokázala, že neošetřené PHB granule se vyskytovaly převážně v amorfní formě. Avšak při použití vyšších koncentrací ošetřujících roztoků se krystalizace PHB stupňovala, protože při použití alkalických roztoků došlo k odstranění jistého množství proteinů z povrchové vrstvy granulí. Analýza jednotlivých vzorků byla prováděna rentgenovou difraktoметриí [24].

Izolací a následnou studií PHB granulí se zabýval také výzkum *B. Gebauer a D. Jendrosska (2006)*. Během studie došlo k izolaci a následné analýze více typů granulí PHB. Denaturované PHB (dPHB) granule bez jakýchkoliv povrchových proteinů byly izolovány z PHB bohatých

buněk *C. necator* za použití NaClO. Nativní granule (nPHB) byly také izolovány z buněčných extraktů *C. necator*, získaných pomocí trojnásobného průchodu přes French press a následnou centrifugací s hustotním gradientem glycerolu, který byl posléze odstraněn dialýzou. Amorfni PHB granule byly připraveny z krystalického materiálu rozpuštěním v trichlormethanu a následné ultrasonifikací. V studii se krystalinita zkoumá enzymaticky, konkrétně hydrolýzou PhaZ7, což je enzym, který je specifický pro amorfni PHB a nemůže hydrolyzovat dPHB. Na analýzu vzorků byla použita vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) [25].

Rovněž studie *M. Portera a J. Yu (1998)* se zabývala krystalinitou PHB v nativních granulích *in situ*. Zdrojem PHB granulí byla bakterie *Cupriavidus necator*. Celý experiment byl prováděn tak, aby mohly být pozorovány pouze vlivy podmínek vnějšího prostředí na chování PHB granulí. Krystalinita PHB byla patrná z velké části u všech experimentů, počínaje suspenzí neošetřených bakteriálních buněk, přes odstředované buňky až po teplotní namáhání buněk. Nepatrnou změnou v krystalizaci polymeru byly buňky, které se nacházely v slabě kyselém prostředí. V tomto experimentu se PHB vyskytovalo z velké části amorfni, avšak stále s přítomností nepatrné krystalické části polymeru. Největší krystalinita polymeru byla pozorována u experimentu, kde docházelo k zahřívání buněčné suspenze a současně s tím docházelo i k odstranění vody z granulí. Tento výsledek potvrzuje fakt ze studie [17], že voda působí v PHB granulích jako tzv. plastifikátor. Pro analýzu vzorků byla ve studii využita technika ATR-FTIR [26].

Získáváním amorfni PHB granulí z buněk *Cupriavidus necator* kultivovaných na odpadním fritovacím oleji na vaření se zabývala *L. Martino a spol. (2014)*. Izolace PHB granulí byla prováděna pomocí alkalázy, SDS a ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). EDTA je chemické činidlo, které v suspenzi vytváří komplexy s dvojmocnými kationty (nejčastěji se jedná o vápenaté a hořečnaté), díky čemuž dochází k destabilizaci vnější strany cytoplazmatické membrány. Na závěr alkaláza rozkládá buněčný materiál, který se v suspenzi nachází po lyzi bakteriálních buněk. Výsledky experimentu byly takové, že izolované PHB granule zůstaly amorfni jen za vlhka a po vysušení došlo ke krystalizaci. Při experimentu byla použita rentgenová difraktometrie jako metoda určení krystalinity a ke studii PHB granulí byla použita diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) [27].

Krystalizaci izolované PHB se ve své práci věnuje i *C. Lauzier a spol. (1992)* Producentem PHA v experimentu byl bakteriální kmen *Alcaligenes eutrophus* (starší název pro *C. necator*). Izolace granulí byla provedena enzymaticky (lysozym a deoxyribonukleáza) s využitím ultrasonifikace. Výsledný polymer byl na povrchu krystalický, zatímco jeho jádro si udržovalo svůj amorfni charakter. Při následném zahřívání došlo ke krystalizaci i samotného jádra. Během měření bylo zjištěno, že amorfni polymer obsahoval určité množství vody, a když došlo k jejímu odstranění prostřednictvím vysušení, polymer začal krystalizovat. Pro výzkum byly použity metody FTIR a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) doprovázené rentgenovou difraktoметриí a DSC [28].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

4.1.1 Použité bakterie

V bakalářské práci byla použita bakterie *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726, která byla získána z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.1.2 Použité chemikálie

- Nutrient Broth, (Himedia), India
- Dihydrogenfosforečnan draselný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Dihydrát hydrogenfosforečnan sodný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Síran amonný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Heptahydrát síranu hořečnatého, (Sigma Aldrich Inc.)
- Fruktóza, p.a., (Lach-Ner, ČR)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethan, (Lach-Ner)
- Ethylendiamintetraacetát sodný, (Lach-Ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, (Sigma-Aldrich)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, (Sigma Aldrich)
- Chlorid hořečnatý, (Thermo Scientific)
- Glycerol, (Lachema)
- Lysozym, (Sigma Aldrich Inc.)
- Deoxyribonukleáza, (Sigma Aldrich Inc.)
- Deionizovaná voda (PureLab systém)

4.1.3 Použité přístroje

- Analytické váhy, Boeco
- Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments
- Temperovaná třepačka Incubator Heidolph 1000, Labicom s.r.o
- Termostat, LS-35
- Temperovaná třepačka (inkubátor) Orbitah shaker ES-20, Biosan
- Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z 36 HK, HERMLE
- Koloidní analyzátor Zetasizer Nano Series, Malvern
- FTIR spektrofotometr Nicolet iS50
- Analytická odstředivka LUMiSizer 611, LUM
- Ultrazvuk Bandelin Sonopuls Ultrasonic Homogeniser
- Epifluorescenční mikroskop Nikon Elipse E200
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

4.2 Kultivace

4.2.1 Příprava inokula

Inokulum pro všechny kultivace bylo připravováno do 100ml Erlenmayerových baněk s obsahem 50 ml média Nutrient Broth. Vysterilizované inokulum (viz níže) bylo buďto

nařikrát zaořkováno bakteriologickou kličkou z agarové plotny (zaořkovaná z kryozkumavky), nebo římó zaořkováno z kryozkumavky obsahující bakterie *Cupriavidus necator* H16. Oba procesy byly prováděny v sterilním prostředí Laminárním boxu Aura mini. Kultivace probíhala 24 hodin na temperované řřepaře při frekvenci řřepání 180 rpm a teplotě 30 °C.

Vřechny sterilizace, jak pro inokulum, tak i pro minerální médium, byly prováděny v uzavřeném tlakovém hrnci po dobu řřibližně 45 minut. Roztok fruktózy se sterilizoval obdobně jen s otevřeným ventilem. Roztoky fruktózy a stopových prvků byly umístěny v laminárním boxu, kde byly sterilizovány UV zářením. V laminárním boxu byly následně tyto roztoky při laboratorní teplotě řřidány do minerálního média.

4.2.2 Živná média

Pro řřípravu inokula bylo používáno submerzní médium Nutrient Broth (NB).

Složení Nutrient Broth:

- Beef extract 10 g·l⁻¹
- Pepton 10 g·l⁻¹
- NaCl 5 g·l⁻¹
- Agar 20 g·l⁻¹

Pro řřípravu produkčního minerálního média pro kultivaci bakterií *Cupriavidus necator* H16 byly použity následující minerální látky:

- (NH₄)₂SO₄ 1 g·l⁻¹
- KH₂PO₄ 1,1 g·l⁻¹
- Na₂HPO₄ · 12 H₂O 11,1 g·l⁻¹
- MgSO₄ · 7 H₂O 0,2 g·l⁻¹
- Fruktosa 20 g·l⁻¹
- Roztok stopových prvků * 1 ml
- Destilovaná voda 1000 ml

*Roztok stopových prvků:

- FeCl₃ 9,7 g
- CaCl₂ 7,8 g
- CuSO₄ 0,156 g
- CoCl₂ 0,119 g
- NiCl₂ 0,118 g
- CrCl₂ 0,062 g
- 0,1 M HCl 1000 ml

Produkční minerální médium bylo řřipravováno do 250 ml Erlenmayerových baněk obsahující 100 ml minerálního media. Stejně jako u inokula (kapitola 4.2.1) byla provedena sterilizace a po vychladnutí roztoku bylo v laminárním boxu řřidáno 5 ml fruktózy (20 g/l), 100 µl roztoku

stopových prvků a 5 obj. % inokula. Připravená produkční média byla kultivována 72 hodin při 30 °C na temperované třepačce při 180 rpm.

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Příprava tris-HCl pufru

Pro přípravu 50 mM tris-HCl pufru o hodnotě pH 8 bylo použito:

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan $6,057 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Navážka Tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 750 ml destilované vody a pH roztoku bylo upraveno přidáním koncentrované HCl na hodnotu 8. Následně byl roztok dolit destilovanou vodou do celkového objemu 1 litr.

4.3.2 Příprava PBS pufru

Pro přípravu 100 mM fosfátového pufru o pH 7,4 bylo použito:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $3,522 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ $27,7272 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Navážka byla rozpuštěna v 1 litru destilované vody a posléze byla upravena koncentrace roztoku na potřebnou hodnotu prostřednictvím přidání destilované vody dle potřeby.

4.4 Postup izolace PHB

Celý proces izolace PHB je spjat s enzymatickým štěpením a mechanickým rozbíjením buněk za pomoci centrifugy (Z 36 HK HERMLE) a ultrazvuku (Bandelin Sonopuls Ultrasonic Homogeniser). Prvním krokem ukončení kultivace bakterií bylo jejich sesbírání odstředěním (5000 rpm, 15 °C, 15 min) celého objemu minerálního média (100 ml). Dále byla usazenina rozsuspenzována ve 100 ml Tris-HCl pufru o hodnotě pH 8 s příměsí 0,1 g lysozymu a 0,037 g EDTY. EDTA v roztoku zastává funkci chelatačního činidla. Takto připravený roztok byl inkubován na temperované třepačce (Orbitah shaker ES–20) při 200 rpm, 40 °C po dobu 3 hodin. Po uplynutí inkubačního času byl roztok centrifugován (5000 rpm, 4 °C, 15 min) a usazenina byla rozsuspenzována v 100 ml studené destilované vodě. Suspenze byla posléze podrobena ultrazvuku. Po ultrazvuku přichází na řadu další centrifugace (2000 rpm, 4 °C, 15 min). Usazenina byla tentokrát rozsuspenzována ve 100 ml 50 mM fosfátovém pufru (pH 7,4) s příměsí 0,2033 g chloridu hořečnatého a 1 mg deoxyribonukleázy. Následně byl roztok umístěn na temperovanou třepačku, kde došlo k další inkubaci při 200 rpm, 40 °C po dobu 2 hodin. Jako další krok přišla na řadu dialýza. Samotná dialýza byla prováděna na magnetické míchačce a celá aparatura byla umístěna v lednici.

Zmíněný postup byl navržen na základě experimentu popsaného v článku [24].

4.4.1 Postup izolace PHB s gradientovou centrifugací

Tento postup byl zpočátku totožný s postupem popsaným výše v kapitole 4.4. Změna nastala až po druhé inkubaci (2 hodiny na temperované třepačce), kdy došlo k přidání glycerolu. První vzorek obsahoval 15 ml 100% glycerolu na 6 ml suspenze obsahující PHB granule. Druhý vzorek byl zhotoven ze směsi 5 ml 100% glycerolu, 10 ml 50% glycerolu na 10 ml suspenze.

Vzorky 3 a 4 byly zhotoveny stejně jako vzorek číslo 1. Takto připravené vzorky byly následně podrobeny odstředění, a to konkrétně 7000 rpm při 4 °C po dobu 20 minut pro vzorky 1, 2, a 3. Třetí vzorek byl dále promyt 30 ml 50 mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) a celý postup s glycerolem byl u něj ještě 2× zopakován. Čtvrtý vzorek byl odstředěn při 5000 rpm, 4 °C po dobu 20 minut. Všechny vzorky byly následně podrobeny dialýze proti 20 mM fosfátovému pufru (pH 7,4). Dialýza byla taktéž prováděna za stálého míchání pomocí magnetické míchače a celá aparatura byla umístěna v lednici jako v kapitole výše. Motivací této úpravy postupu byla snaha o šetrnější separaci uvolněných granulí od supernatantu pomocí centrifugace v hustotním gradientu vzniklém ve směsi voda-glycerol.

Postup izolace PHB obohacený o glycerol byl proveden na základě experimentu popsáního v bodě 4.4 a doplněn poznatky z experimentu publikovaném v referenci [25].

4.5 Vizualizace granulí pomocí fluorescenční mikroskopie

Za účelem vizualizace granulí byly použity standardní techniky fluorescenčního barvení buněk fluorescenčními barvivy specifickými pro hydrofobní buněčné struktury (Nilskou červeně a BODIPY).

4.5.1 Barvení Nilskou červení

Po přípravě suspenze (viz.4.4 a 4.4.1,) následovalo stočení 25 ml suspenze na centrifuze (8000 rpm, 2 min) a následná fixace 1 ml 20% ethanolu při 4 °C po dobu 10 minut. Nakonec byla suspenze dvakrát promyta 1 ml fosfátového pufru.

Ze zásobního roztoku Nilské červeně, jejíž koncentrace činila 1 mg·ml⁻¹ (rozpuštěno v DMSO), bylo přidáno do 1 ml vzorku buněk 5 µl roztoku nilské červeně. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 15 minut.

Nilská červeně excituje při vlnové délce 488 nm, emise byla snímána v kanále 590 ± 35 nm.

4.5.2 Barvení BODIPY

Suspenze vzorku byla připravena stejně jako při barvení Nilskou červení (viz. 4.5.1).

Zásobní roztok barviva BODIPY 439/503 byl uchováván v DMSO o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Do vzorku buněčné suspenze o objemu 1 ml bylo přidáno 5 µl barviva.

Excitace byla pozorována při vlnové délce 488 nm a emise byla snímána v zeleném kanále - 535 ± 35 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci mé bakalářské práce byly provedeny 3 druhy experimentů, přičemž 1. typ experimentů se zaměřoval na optimalizaci měřících technik a testování ideálního času ultrasonifikace. Následně 2. soubor experimentů se zaměřil na pokus o izolaci nativní formy PHA z bakterií a testoval vliv amplitudy ultrasonifikace na krystalizaci polymeru a celkovou izolaci PHA. A nakonec 3. skupina experimentů navázala na výsledky předchozího a nastavila ideální amplitudu ultrasonifikace a zároveň testovala další možné úpravy postupu izolace amorfních PHA granulí z bakteriálních buněk.

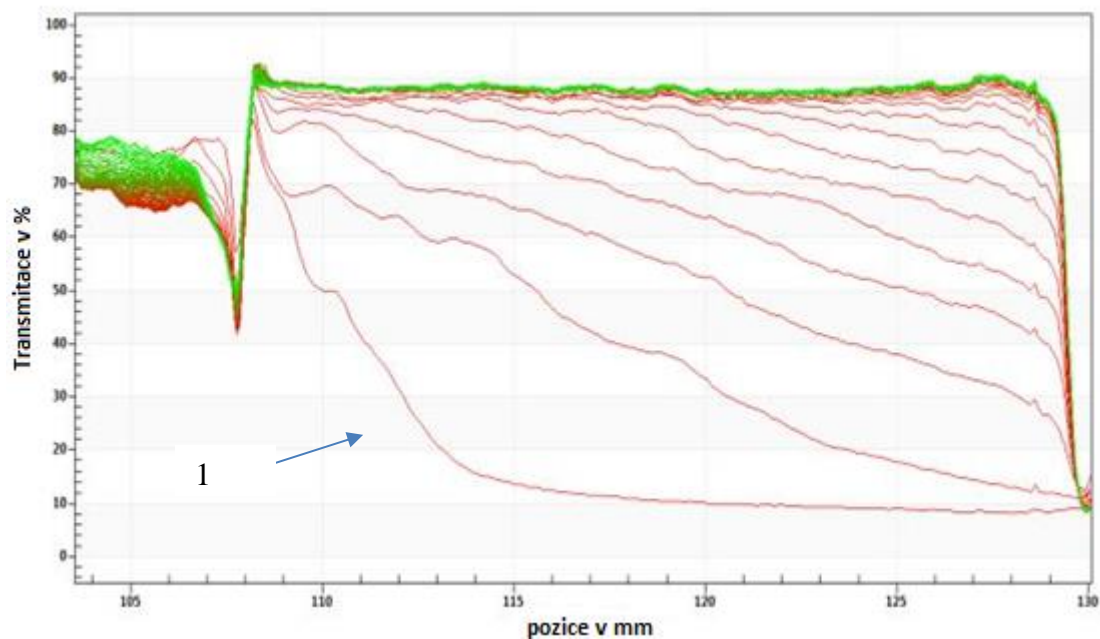
5.1 Optimalizace měřících technik

Během prvního experimentu byla několika analytickými metodami charakterizována krystalinita a koloidní vlastnosti vzorku mechanicky rozrušených buněk *Cupriavidus necator* H16 (viz 4.4). Samotné měření probíhalo po ukončení ultrasonifikace, kdy tyčový ultrazvuk byl nastaven na 95% amplitudy a jednotlivé vzorky se lišily pouze časem vystavení ultrazvuku. Časová změna byla sestavena následovně: 0 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s, 180 s, 210 s, 240 s, 270 s, 300 s a 360 s. Samotné měření bylo prováděno pomocí analytické odstředivky, dynamického rozptylu světla (DLS) a infračervené spektroskopie (FTIR). Cílem experimentů byl jednak výběr optimálních parametrů tohoto klíčového kroku izolačního postupu, a dále také otestování využitelnosti případně optimalizace navržených analytických technik.

5.1.1 Analytická odstředivka (Lumisizer)

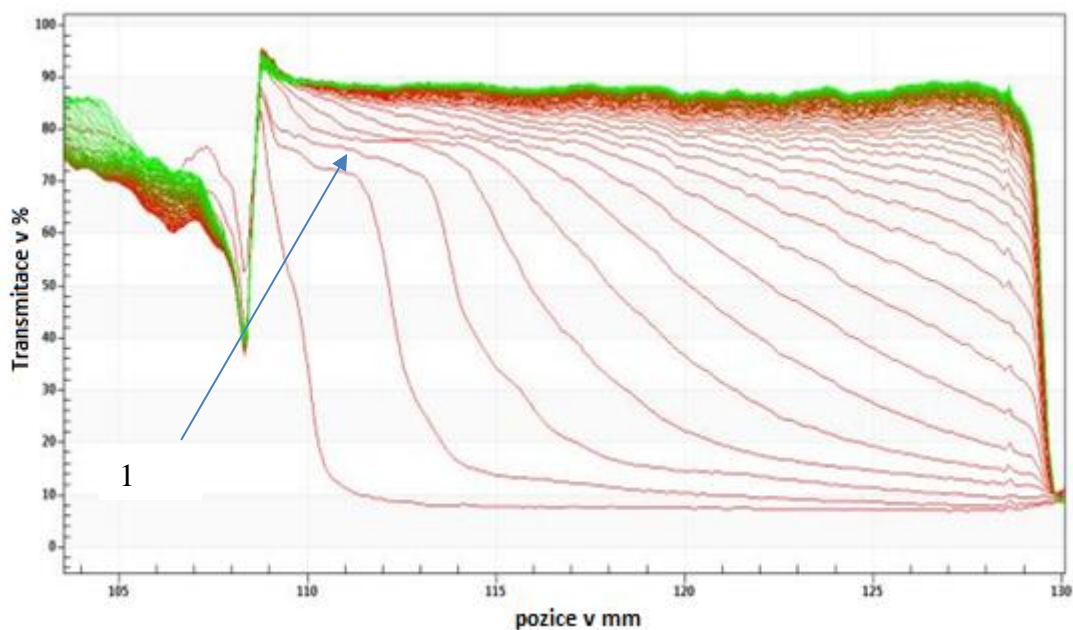
Analytická centrifugace (LUMiSizer 611) byla pro tento druh pokusu použita poprvé. A proto nejprve došlo k optimalizaci celého procesu. Připravené vzorky byly testovány pro různé otáčky a odlišný čas (2000 rpm, 15 min; 2000 rpm, 30 min), dokud nebylo nalezeno optimální nastavení (4000 rpm, 30 min), při nižších otáčkách a kratším čase nedocházelo k úplné sedimentaci, proto byl potřebný posun k vyšším hodnotám. Analytická odstředivka vyobrazila chování suspenze během centrifugace a dala nám také údaj o rychlosti sedimentace jednotlivých roztoků. Taktéž v pozdějších experimentech dokázala vyhodnotit přítomnost různých frakcí v jednotlivých suspenzích.

Vzorek 0 s, viz obrázek 6, je příkladem polydisperzního systému, který relativně rychle sedimentuje, což můžeme vidět ze skoseného prvního profilu (bod 1) a z velkých posunů transmittančních profilů zaznamenaných v jednotlivých po sobě následujících časech odstřeďování.

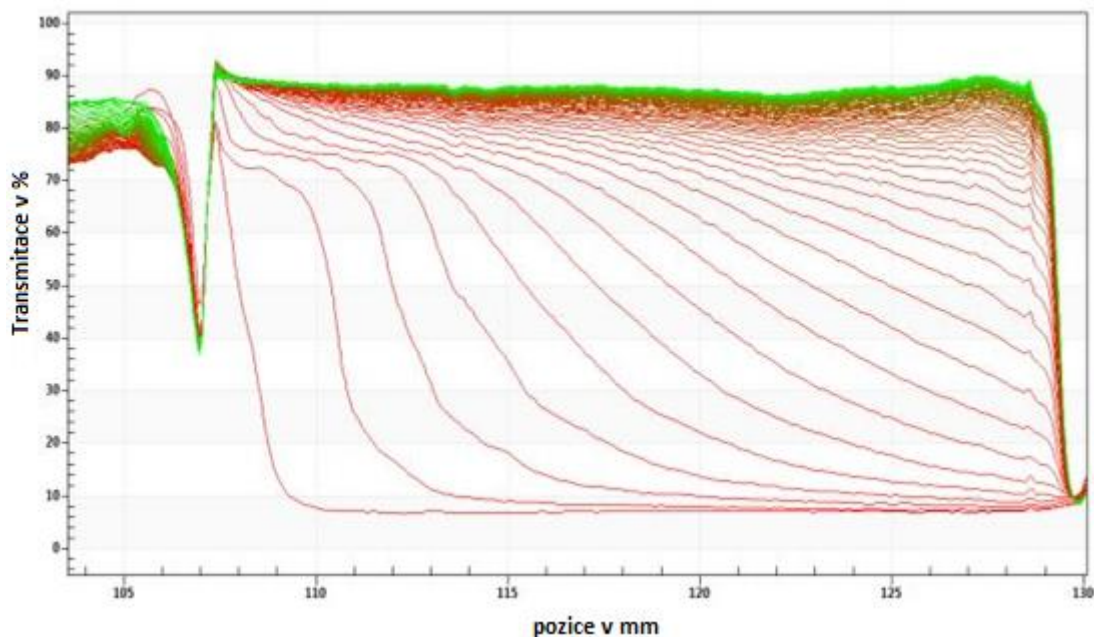


Obrázek 6: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 0 s.

Všechny ostatní vzorky byly již velmi podobné, což lze vidět v porovnání obrázků 7 a 8. Ve všech případech (obrázky 7 – 8, 31 – 39) se jednalo o polydisperzní systém. Už na začátku dochází k podstatně pomalejší sedimentaci částic než u vzorku 0 s. V bodě 1 vyznačeném v obrázku 7 lze vidět postupné usazování jemných částic, což může značit přítomnost druhé frakce. Analytická centrifugace se ukázala být vhodnou měřicí technikou pro její rychlé a jednoduché vyhodnocení. Zbylé výsledky jsou doloženy v kapitole 9.



Obrázek 7: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 30 s.

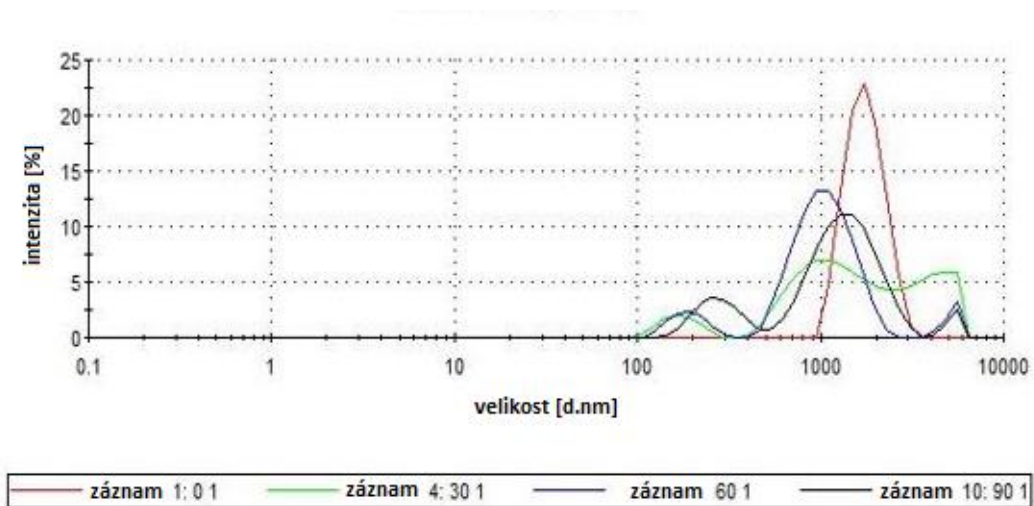


Obrázek 8: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 270 s.

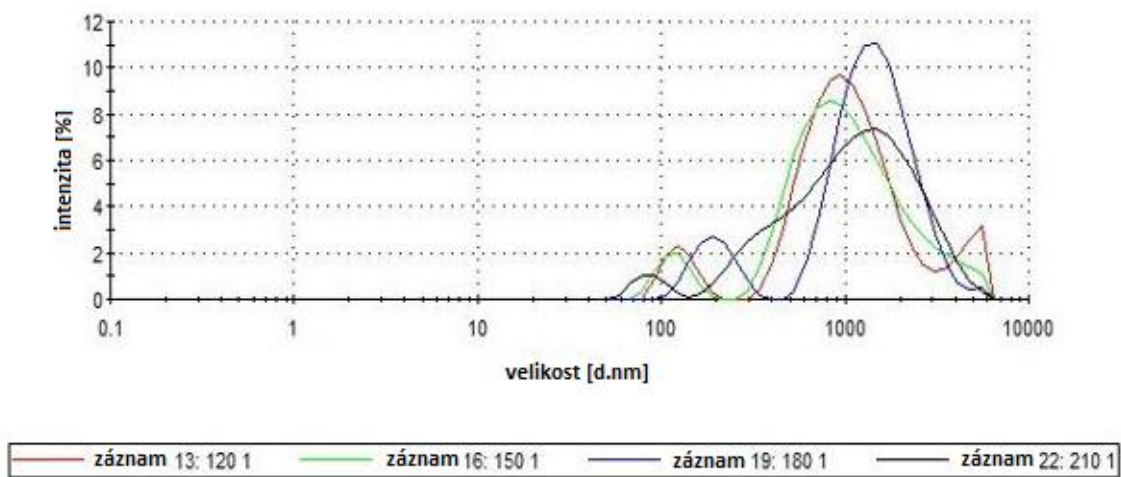
5.1.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Pomocí DLS byly získány distribuce velikosti jednotlivých částic v roztocích. Pro měření byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Jednotlivé bakteriální suspenze (0; 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210; 240; 270; 300 a 360 s) byly 10× zředěny pro dosažení přesnějších výsledků, avšak hodnoty byly i tak výrazně zkresleny, jelikož tato metoda přepočítává velikost buněk na kulovité částice, přičemž tvar bakterií je spíše tyčinkovitý.

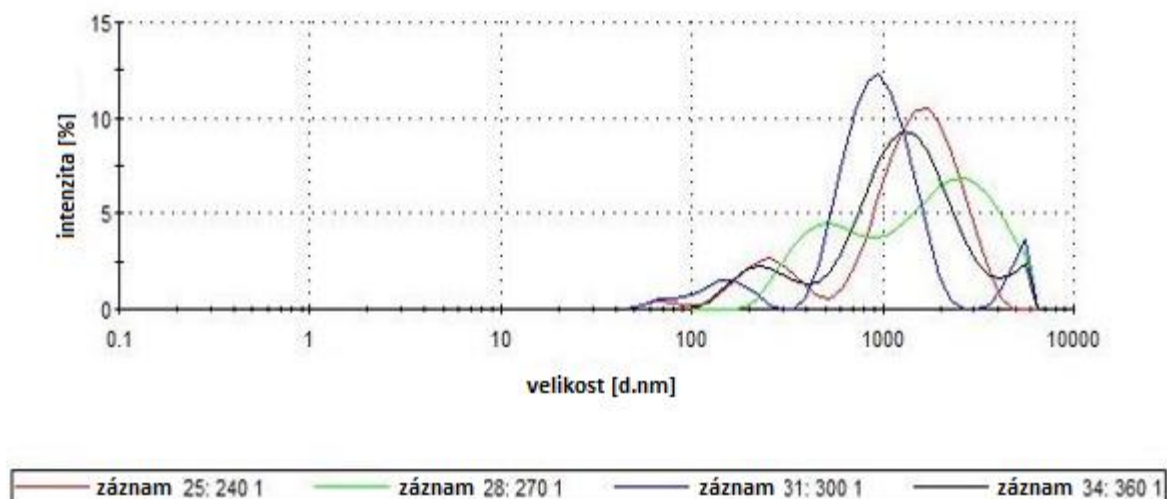
Na obrázku 9 lze vidět, že vzorek 0 s vykazoval pouze jednu velkou frakci, což naznačuje, že se v daném roztoku nacházejí pouze nerozbité buňky. V ostatních vzorcích lze pozorovat výskyt více píků, což značí přítomnost více frakcí o rozdílné velikosti částic. Srovnáme-li naměřené výsledky naředěných suspenzí (30; 60; 150; 210; 300; 360 s) viz obrázky 9 – 11, lze pozorovat postupnou tendenci zmenšování částic. Z těchto výsledků (každé měření bylo provedeno 3×) lze usoudit, že ultrasonifikace zdárně slouží k rozbíjení bakteriálních buněk. Metoda DLS byla použita z důvodů rychlé a spolehlivé analýzy bakteriálních suspenzí.



Obrázek 9: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vzorcích (0 s – červená; 30 s – zelená; 60 s – modrá; 90 s – černá).



Obrázek 10: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vzorcích (120 s – červená; 150 s – zelená; 180 s – modrá; 210 s – černá).



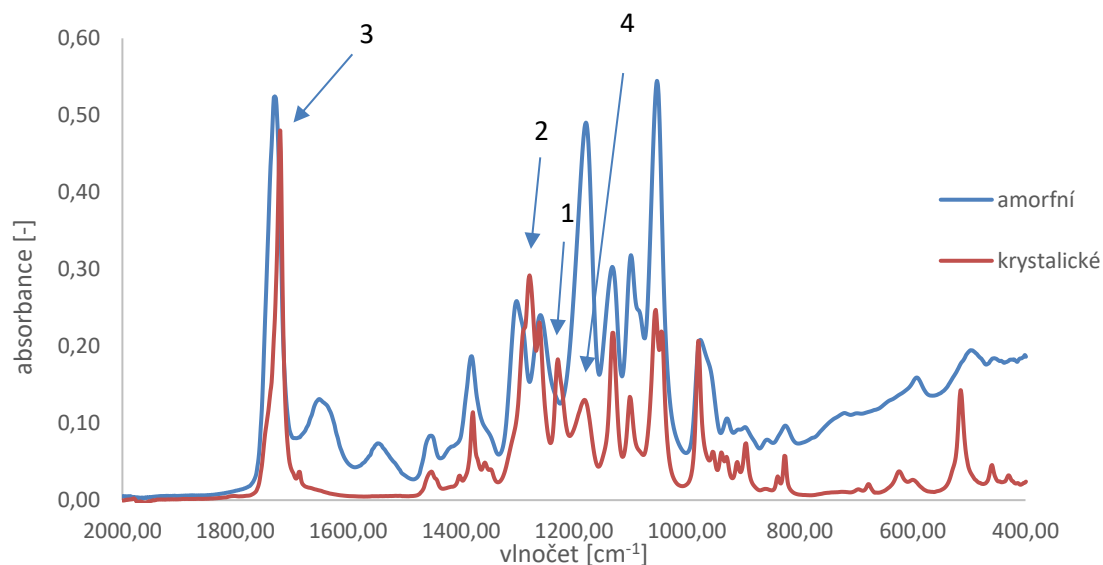
Obrázek 11: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vzorcích (240 s – červená; 270 s – zelená; 300 s – modrá; 360 s – černá).

5.1.3 Infračervená spektroskopie

Pro stanovení krystalinity PHB v jednotlivých vzorcích byla použita metoda FTIR, jelikož se osvědčila jako velmi užitečná a spolehlivá metoda (viz [17,26,28]). Konkrétně byl k měření použit přístroj Nicolet iS50.

Na obrázku 12 je zobrazeno porovnání dvou spekter PHB částic ve dvou formách, a to konkrétně v amorfni a krystalické formě. Charakteristické píky odpovídající krystalinitě jsou znázorněny v bodech 1 (1230 cm^{-1}), 2 (1270 cm^{-1}) a také šikmý pík v bodě 3 (1720 cm^{-1}). Pík zobrazený v bodě 4 (1180 cm^{-1}) klesá s klesajícím obsahem amorfniho PHB čili u krystalického spektra roste. Na základě porovnání naměřených spekter jednotlivých vzorků v experimentu, zejména specifických píků byla hodnocena krystalizace. Na obrázku 12 jsou zobrazena pouze modelová data.

Výsledky měření jednotlivých vzorků prokázaly že vzorek 0 s byl zcela amorfni, což bylo způsobeno tím, že PHB granule se stále nacházely v intracelulárním prostředí buněk, a tudíž nebyly vystaveny ultrazvuku. Nedošlo tak k narušení amorfniho stavu PHB granulí. Také vzorky 60 s a 90 s vykazovali za mokra zcela amorfni charakter a až po vysušení byla patrná tvorba píků specifických pro krystalinitu PHB. Vzorky 120 s–360 s vykazovaly postupně se zvyšující krystalinitu i bez následné dehydratace. Závěrem měření bylo, že ideální čas vystavení ultrazvuku byl 60–90 sekund pro 95% amplitudu.



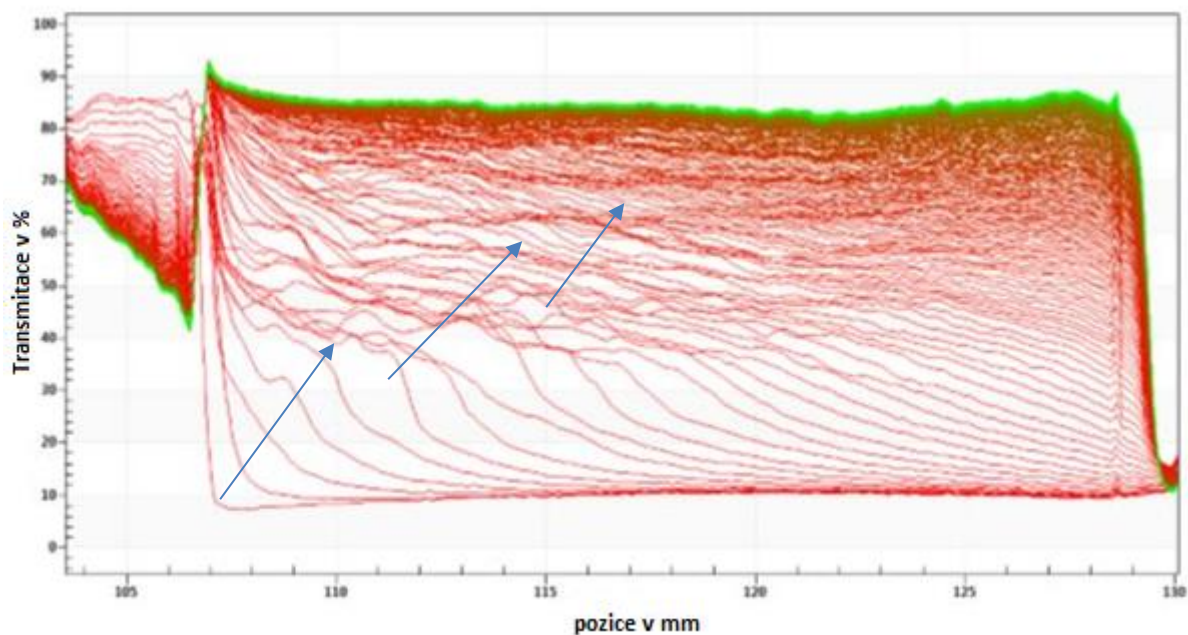
Obrázek 12: Modelová FTIR spektra PHB v amorfním (modrá) a krystalickém stavu (červená).

5.2 Izolace nativních PHB granulí

V rámci 2. skupiny experimentů byl proveden kompletní izolační protokol amorfních PHB granulí z bakteriální buňky. Na základě výsledků z předchozích experimentů byl realizován již celý postup izolace (viz 4.4) pro vzorky 60 s a 90 s při 95% amplitudě ultrazvuku. Následně se v izolačním postupu testoval vliv amplitudy ultrasonifikace na krystalizaci polymeru po kompletní izolaci a přečištění PHA.

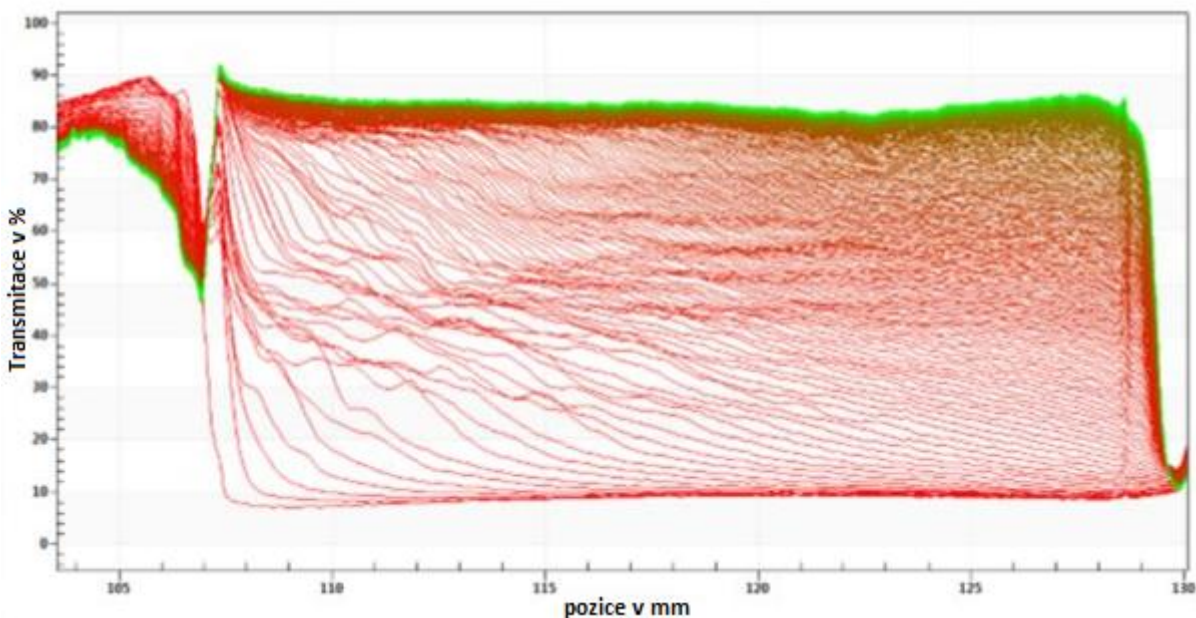
5.2.1 Izolace PHB

Na základě získaných výsledků z FTIR analýzy (ideální čas sonifikace 60 a 90 s), byl dále realizován experiment na izolaci nativních PHB granulí. Na obrázku 13 je zobrazena sedimentace vzorku 60 s při 95% amplitudě ultrazvuku. Můžeme zde pozorovat polydisperzní systém s rychlou sedimentací velkých částic vzhledem k pozici prvního profilu. Dále lze na obrázku 13 vidět zvýrazněná místa (modré šipky), kde dochází k akumulaci profilů, což indikuje sedimentaci menších částic, a tedy přítomnost více frakcí. Na konci je vidět zákal tvořený jemnými částicemi, který sedimentuje pomalu.



Obrázek 13: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 60 s ultrasonifikace.

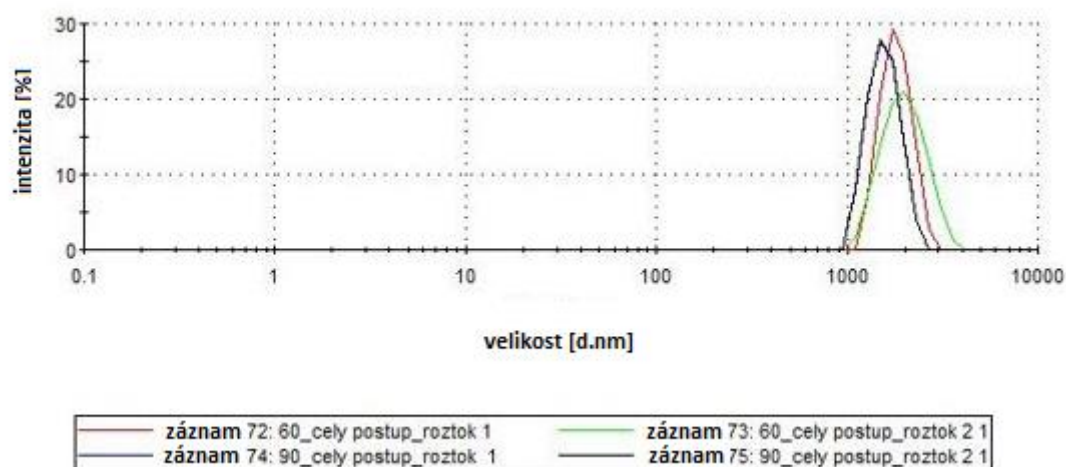
Příčemž vzorek 90 s vykazuje podobné závěry viz obrázek 14 jako vzorek 60 s. Jediný výraznější rozdíl je ve vzdálenosti prvních profilů od sebe, kde na obrázku 14 lze pozorovat tyto profily hustěji na sobě, což značí pomalejší sedimentaci, a tudíž se dá předpokládat, že i menší velikost sedimentujících částic.



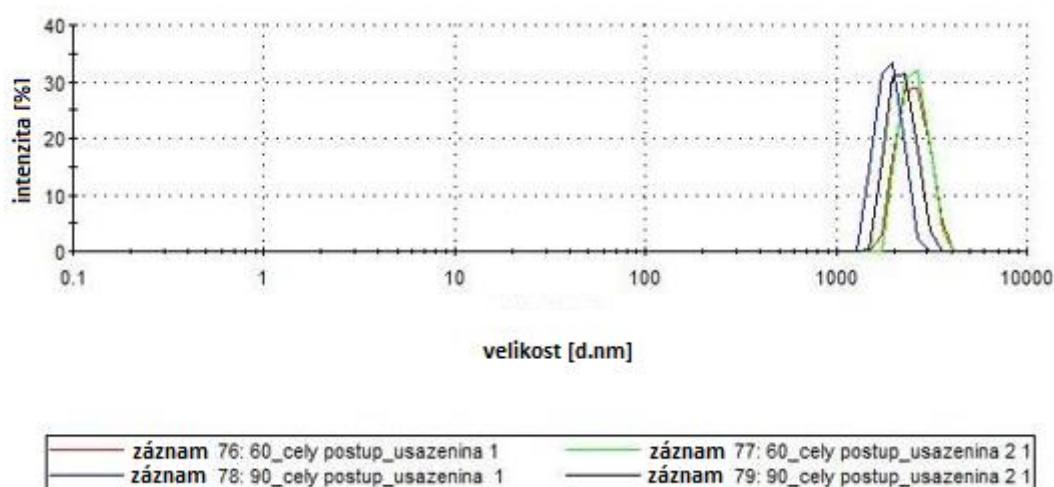
Obrázek 14: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 90 s ultrasonifikace.

Dále byly tyto vzorky proměřeny i pomocí techniky DLS, kde z naměřených výsledků není patrný výrazný rozdíl mezi roztoky 60 s a 90 s. Při porovnání vzorků roztoků a usazenin (60 a 90 s), viz obrázek 15 a 16, lze pozorovat mírný posun ve velikosti jednotlivých částic.

Z toho vyplývá, že v usazenině se pravděpodobně nacházely pozůstatky bakteriálních buněk, nebo již došlo k agregaci PHB granulí.



Obrázek 15: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vzorcích (červená – 60 s 1; zelená – 60 s 2; modrá – 90 s 1; černá – 90 s 2). Pro měření byl použit roztok nad usazeninou, kde se nacházelo méně částic.



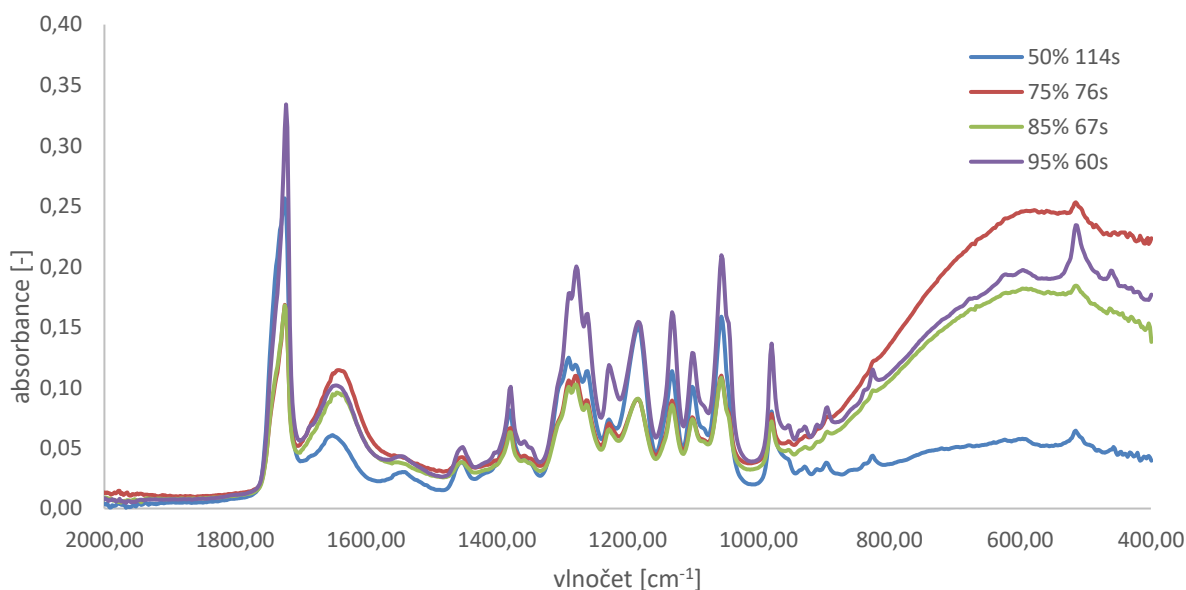
Obrázek 16: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vzorcích (červená – 60 s 1; zelená – 60 s 2; modrá – 90 s 1; černá – 90 s 2). Pro měření byl použit roztok zhotovený zředěním usazeniny.

Z FTIR výsledků bylo patrné, že vzorky byly nejprve amorfni, ale při postupném vysychání vykazovaly krystalický charakter. Ze závěru měření vyplývá, že PHB granule byly amorfni, dokud nedošlo k jejich dehydrataci. Z výsledků DLS, ale bylo zjištěno, že detekované částice byly příliš velké, což naznačuje, že buňky nebyly ultrazvukem dostatečně rozbity. A proto se začaly testovat různé amplitudy ultrasonifikace s ohledem na efektivitu rozbíjení buněk a krystalizaci uvolněných PHB granulí.

5.2.2 Vliv amplitudy ultrasonifikace na krystalizaci polymeru

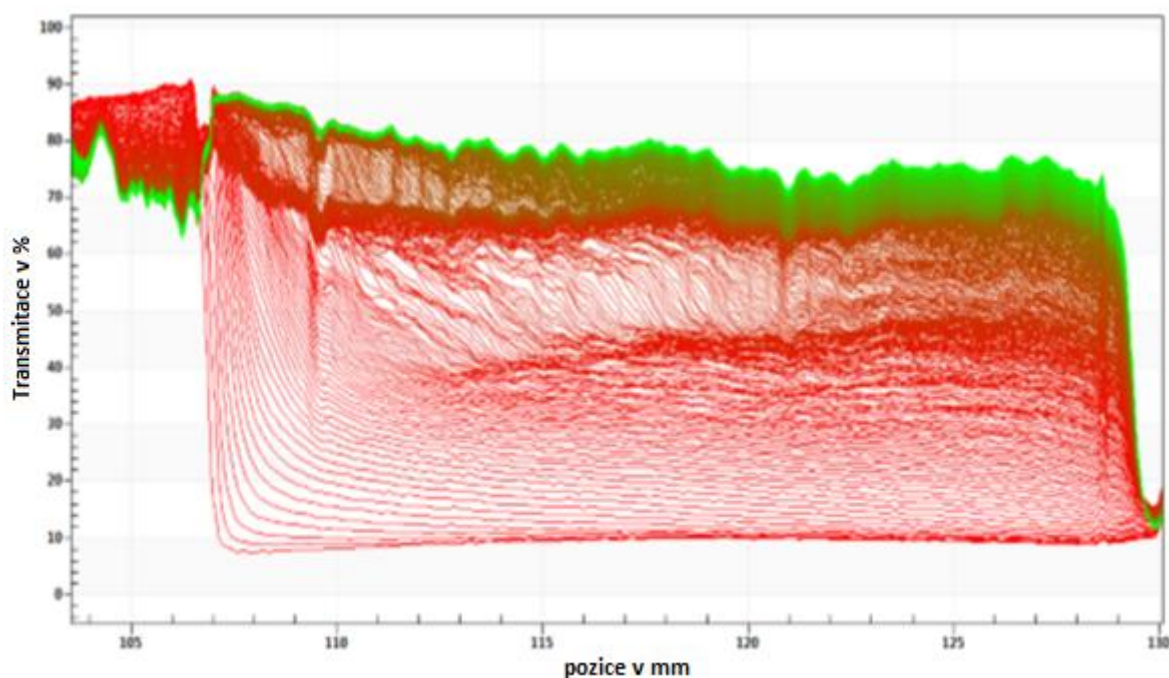
Jak už bylo zmíněno na začátku této kapitoly, bylo nutno otestovat vliv amplitudy jejím postupným snižováním, kdy doba sonifikace byla vždy přepočítána vůči dané hodnotě amplitudy, tzn: 1) 95% – 60 s, 2) 95% – 90 s, 3) 85% – 67 s, 4) 85% – 101 s, 5) 75% – 76 s, 6) 75% – 114 s, 7) 50% – 114 s, 8) 50% – 171 s, 9) 35% – 163 s, 10) 35% – 244 s, 11) 20% – 285s, 12) 20% – 428 s a 13) 10% – 855 s. Pro orientaci a porovnání byl měřen i vzorek bakterií v minerálním médiu a vzorek, který byl podroben celému izolačnímu postupu pouze bez vystavení ultrazvuku. A proto bylo nejprve proměřeno prvních 8 vzorků (tj. amplitudy od 95% po 50%). Výsledky analytické centrifugace zobrazily pro prvních 5 vzorků (95% – 60 s; 95% – 90 s; 85% – 67 s; 85% – 101 s; 75% – 76 s) znatelné rozdělení do frakcí podle rozdílné rychlosti sedimentace. Ve zbylých 3 vzorcích (75% – 114 s; 50% – 114 s; 50% – 171 s) lze pozorovat pouze postupnou sedimentaci všech částic. Vybraná data z experimentu jsou předmětem přílohy (obrázky 40 a 41).

Proměřením vzorků (95% – 60 s; 95% – 90 s; 85% – 67 s; 85% – 101 s; 75% – 76 s; 75% – 114 s; 50% – 114 s a 50% – 171 s) pomocí FTIR se zjistilo, že PHB granule ve vzorcích jsou částečně v krystalickém stavu, což značí přítomnost píků u 1230 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} a šikmý pík u 1730 cm^{-1} . Z výsledků rovněž vyplývá, že krystalizace je tím vyšší, čím vyšší je amplituda ultrasonifikace viz obrázek 17. Díky těmto poznatkům se přešlo na testování ještě nižších amplitud (35% – 163 s; 35% – 244 s; 20% – 285 s; 20% – 428 s a 10% – 855 s), ze kterých bylo zjištěno, že jednotlivé vzorky jsou za hydratovaného stavu zcela amorfní.



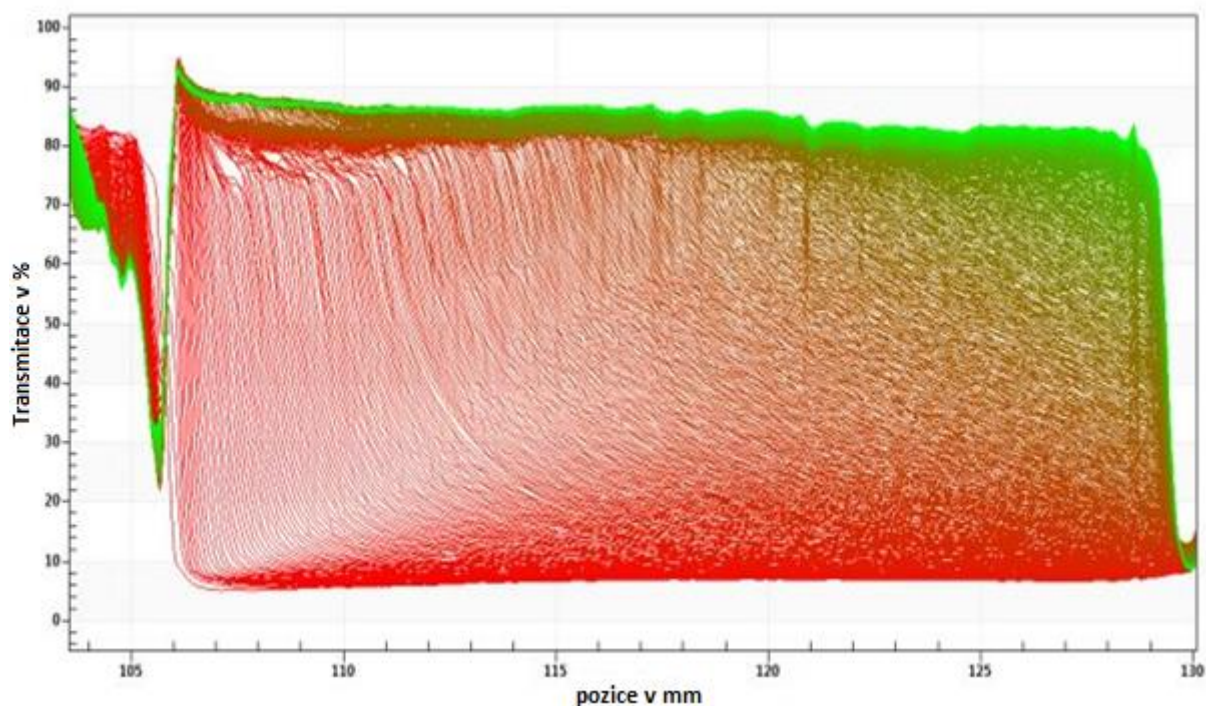
Obrázek 17: Porovnání vybraných FTIR spekter vzorků.

Pro další analýzu vzorků (35% – 163 s; 35% – 244 s; 20% – 285 s; 20% – 428 s a 10% – 855 s) o různé amplitudě ultrazvuku byla využita analytická centrifugace, ke byl prokázán výskyt více frakcí. Zejména pak bylo patrné samotné usazování malých částic v roztoku. Nicméně výsledky mezi jednotlivými vzorky nebyly výrazněji odlišné viz obrázek 18.

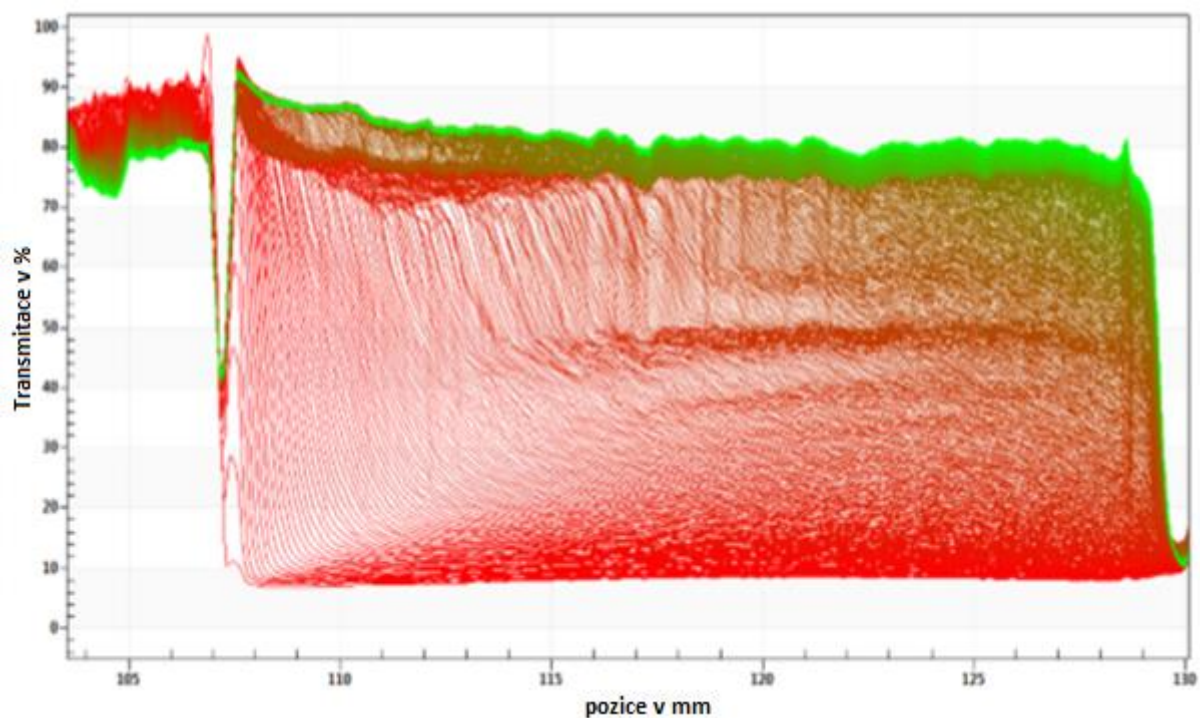


Obrázek 18: *Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 35% - 163 s.*

V rámci testování vlivu amplitudy bylo pro porovnání (se vzorky amplitud, viz výše) provedeno i odstředění vzorku minerálního média (obrázek 19) a vzorku po provedení celého postupu bez vystavení ultrazvuku (obrázek 20). Tyto vzorky se lišily jenom v enzymatickém namáhání bakteriálních buněk, konkrétně lysozym narušuje bakteriální stěnu buňky a tím dopomáhá k jejímu rozštěpení a deoxyribonukleáza slouží k odstranění přebytečné DNA z bakteriální suspenze. Za uvedených podmínek jsou patrné změny v počtu frakcí a díky těmto výsledkům lze usuzovat, že samotné enzymy odvádí podstatnou práci při procesu izolace. V obou případech se nicméně jedná o polydisperzní systém s postupnou sedimentací.



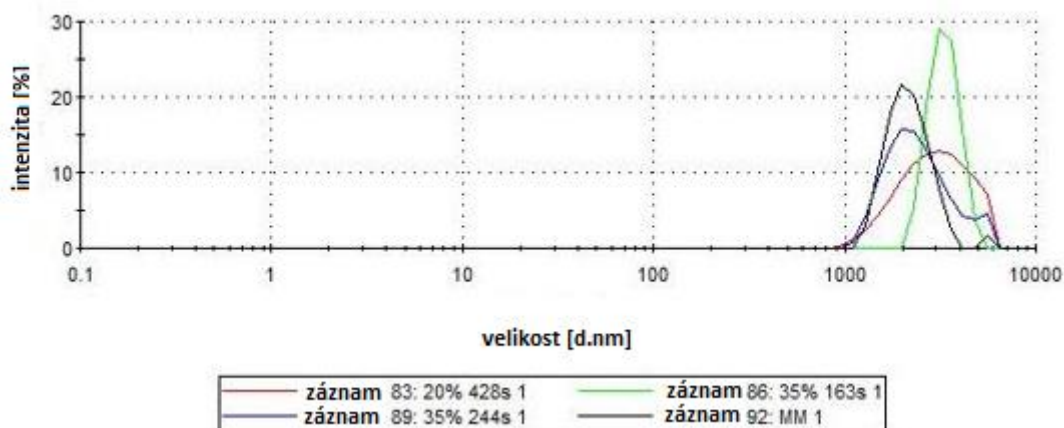
Obrázek 19: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek bakteriálních buněk v minerálním médiu.



Obrázek 20: Výsledky sedimentační analýzy vzorku po izolačním postupu bez použití ultrazvuku.

Jak už bylo zmíněno na začátku této kapitoly, prostřednictvím metody FTIR byl zjištěn částečně amorfní charakter všech vzorků, nicméně z výsledků měření DLS je patrné, že hodnoty pro všechny vzorky jsou příliš vysoké s porovnáním velikostí se vzorkem bakteriálních buněk

v minerálním médiu (červená – 20% 428 s; zelená – 35% 163 s; modrá – 35% 244 s a černá – minerální médium – MM) (viz obrázek 21). Na základě těchto výsledků bylo usouzeno, že buňky nejsou dostatečně rozbité.



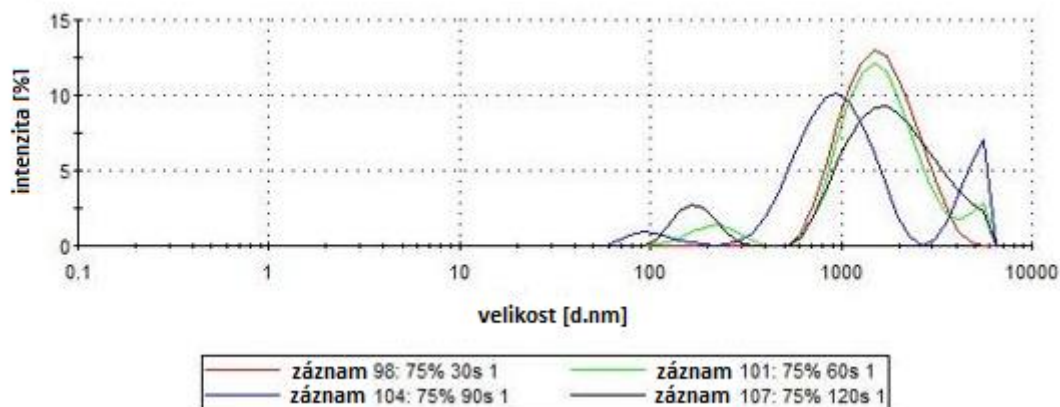
Obrázek 21: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vybraných vzorcích (červená – 20% 428 s; zelená – 35% 163 s; modrá – 35% 244 s černá – minerální médium – MM). Současně proběhlo i srovnání se vzorkem obsahující minerální médium.

5.3 Optimalizace vybraných izolačních kroků nativních PHB granulí

Během 3. skupiny experimentů byl zařazen test 75% amplitudy ultrazvuku v závislosti na dobu působení vůči bakteriálním suspenzím. Jednotlivé vzorky byly pojmenovány dle času sonifikace: 1) 0 s, 2) 30 s, 3) 60 s, 4) 90 s, 5) 120 s, 6) 150 s, 7) 180 s, 8) 210 s. Následně byl pro nejlepší interval sonifikace proveden celý postup izolace (viz 4.4), konkrétně: a) 30 s, b) 40 s, c) 50 s, d) 60 s. V rámci 3. experimentu byl vyzkoušen odlišný postup izolace (viz 4.4.1) pro vzorky 75% 30 s a 75% 40 s.

5.3.1 Časová řada 75% amplitudy

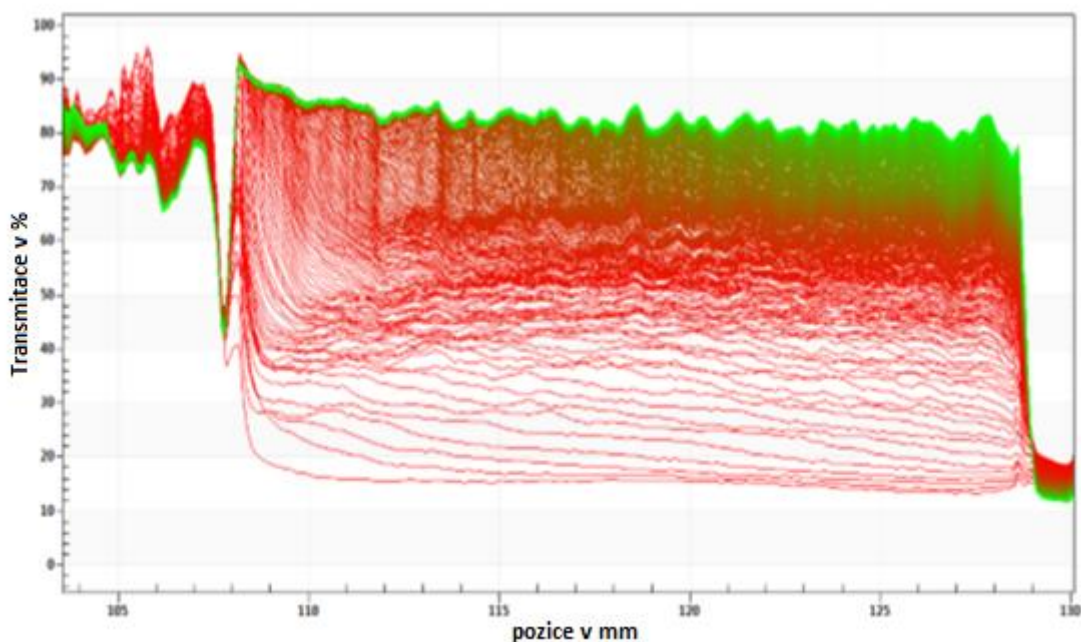
Časová řada 75% amplitudy byla testována stejně jako v 5.1, čili k měření došlo hned po ukončení ultrasonifikace. Nejprve byla proměřena velikost částic pomocí metody DLS, ze které bylo patrné, že došlo k rozpadu bakteriálních buněk a uvolnění granulí PHB viz obrázek 22 (zbylé vzorky viz kapitola 9).



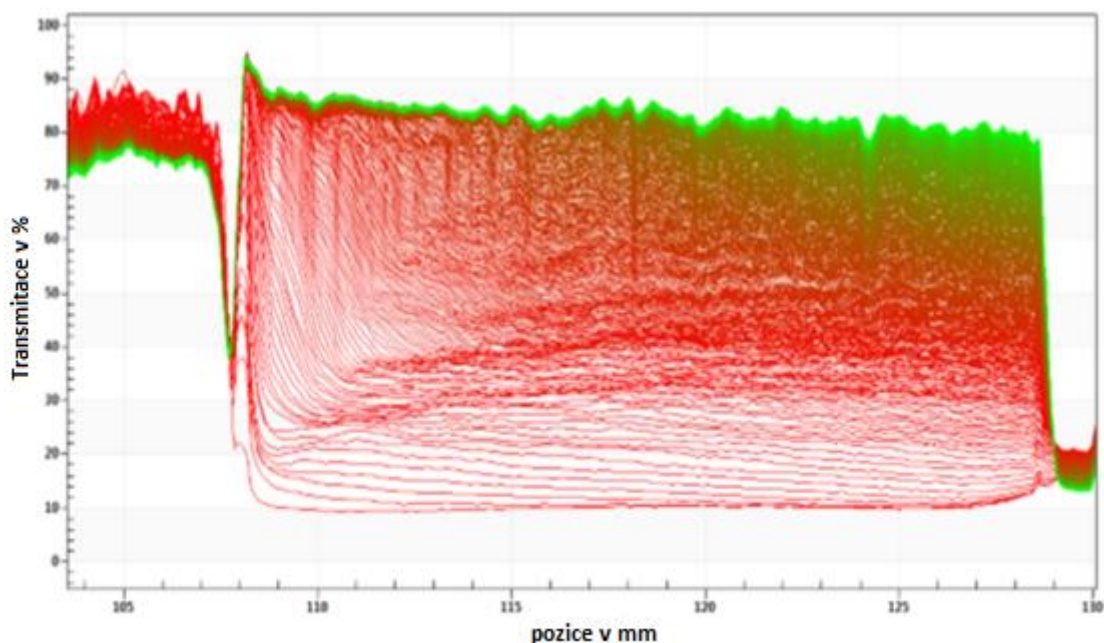
Obrázek 22: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vybraných vzorcích (červená – 75% 30 s; zelená – 75% 60 s; modrá – 75% 90 s černá – 75% 120 s).

Rovněž i tu byly vzorky podrobeny analýze FTIR, kde bylo zjištěno, že nejlepší výsledky v rámci amorfního charakteru vychází v intervalu od 30 do 60 sekund.

Z výsledků analytické odstředivky (obrázek 23) je patrné, že se jedná o polydisperzní suspenzi. Lze nicméně pozorovat výskyt minimálně dvou separátních frakcí. Při porovnání vzorků 30 s a 50 s (viz obrázek 23 a 24) lze vidět postupně jednodušší profily v případě 50 s ultrasonifikace, což značí pomalejší sedimentaci.

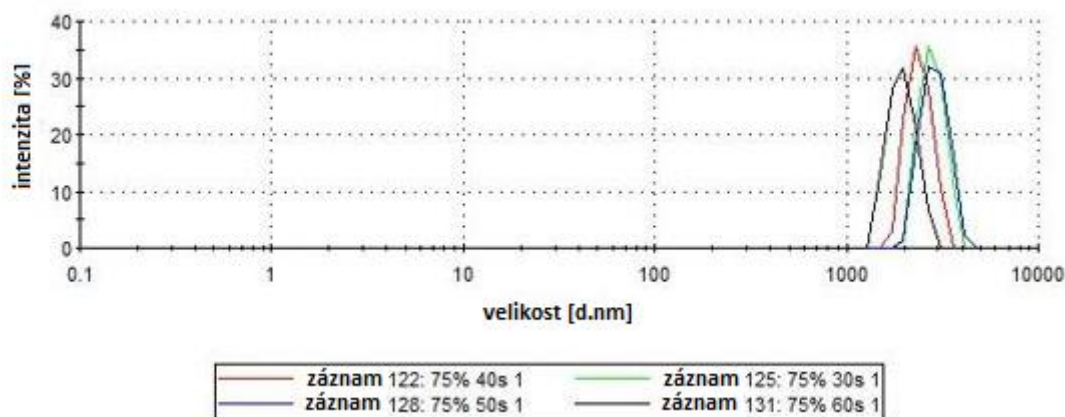


Obrázek 23: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 30 s ultrasonifikace.



Obrázek 24: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 50 s ultrasonifikace.

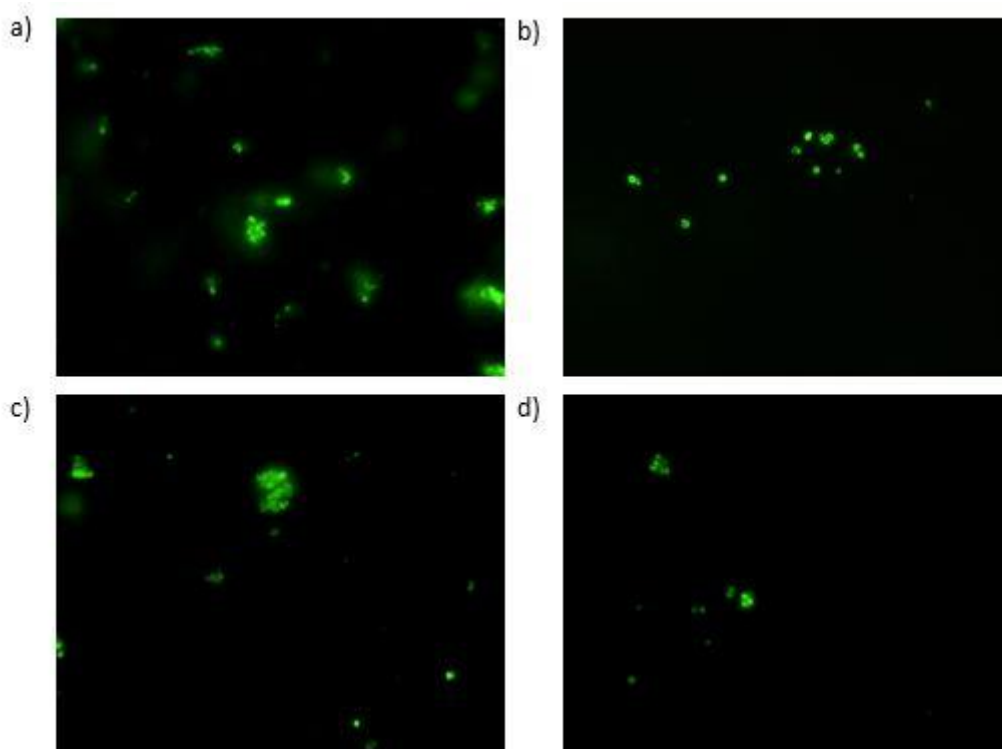
Avšak výsledky měření DLS prokázaly poměrně vysoké hodnoty velikostí částic u jednotlivých vzorků (červená – 75% 40 s; zelená – 30 s; modrá – 75% 50 s a černá – 60 s) viz obrázek 25. Závěrem měření byla domněnka, že buňky stále nejsou rozbité.



Obrázek 25: Srovnání distribucí velikostí částic v jednotlivých vzorcích (červená – 75% 40 s; zelená – 75% 30 s; modrá – 75% 50 s a černá – 75% 60 s).

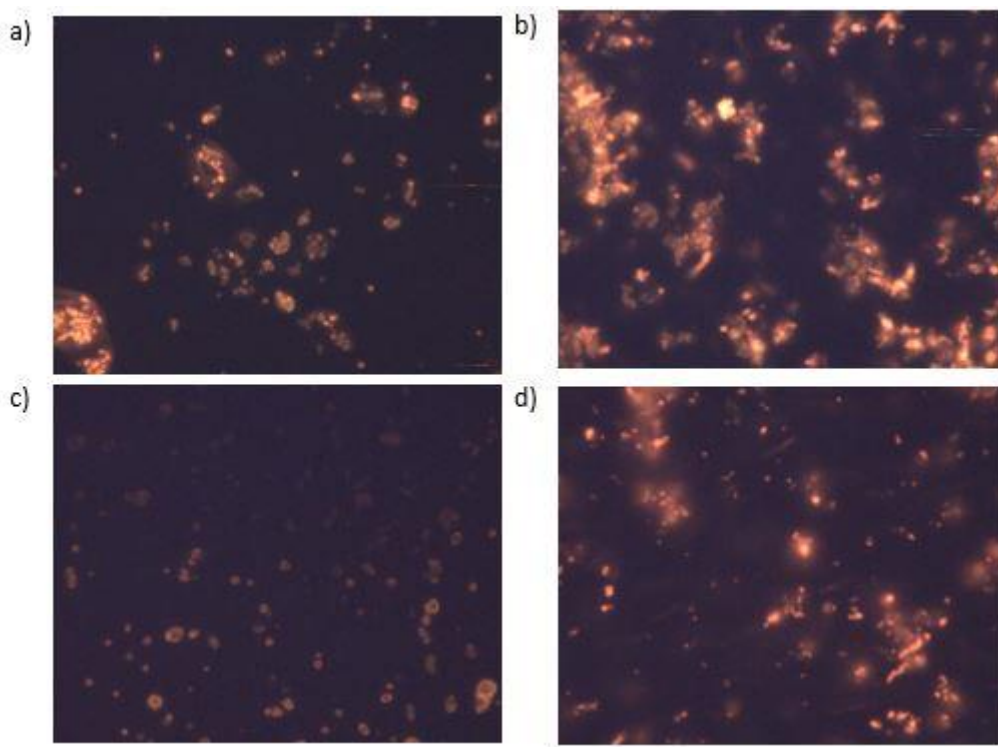
Pro potvrzení či vyvrácení této domněnky ohledně nerozbitých bakteriálních buněk byl použit mikroskop (Nikon Elipse E200 s fotoaparátem Nikon Coolpix5400). Jednotlivé vzorky a) 75% 30 s; b) 75% 40 s; c) 75% 50 s a d) 75% 60 s byly připraveny podle postupů v bodech 4.5.1 a 4.5.2. Na obrázku 26 lze vidět jednotlivé snímky vzorků roztoků. Bylo použito barvivo bodipy, které je charakteristické svým hydrofobním charakterem a v buňkách se váže na hydrofobní ohraničení buněk – fosfolipidovou dvojvrstvu a na hydrofobní granule PHA. Co se týče porovnání vzorků, tak ve vzorku a) byl patrný větší počet bakterií než v ostatních vzorcích. Ve vzorku b) bylo vidět jisté ohraničení buněk (v ostatních vzorcích to nebylo tak patrné) a již

znatelný úbytek bakterií. Na snímku se vzorkem c) byly krásně vidět dva druhy buněk, mohlo se tedy jednat o nepoškozené buňky a o uvolněné granule. Snímek d) se příliš neliší od buněk zobrazených na snímku b), avšak ohrazení není tak znatelné.



Obrázek 26: Snímky jednotlivých vzorků z mikroskopu. Jedná se o barvivo bodipy a vzorky jsou odebrány z roztoku nad usazeninou jednotlivých suspenzí.

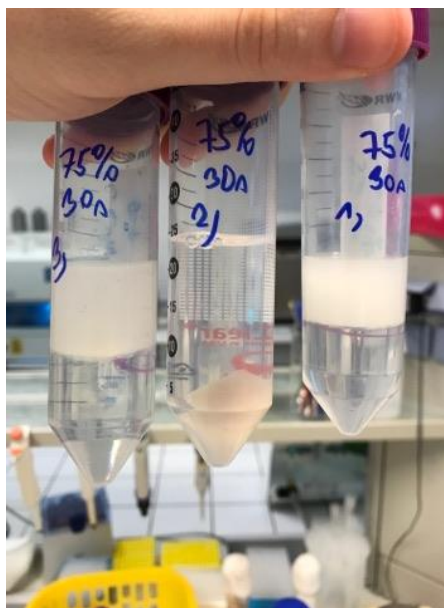
Také na obrázku 27 lze pozorovat snímky vzorků (a) 75% 30 s; b) 75% 40 s; c) 75% 50 s a d) 75% 60 s), které byly připraveny z usazenin jednotlivých suspenzí. Pro mikroskopování bylo použito barvivo nilská červeň. Usazeniny musely být oproti roztokům ještě navíc 10× zředěné z důvodů velké koncentrace buněk, a i tak se v nich nacházelo mnohonásobně více bakterií. U usazenin bylo pozorováno i velké množství nečistot, v tomto případě buněčných komponent. Nilská červeň byla užitečnější pro pozorování nečistot ve formě buněčných komponent, zatímco barvivo bodipy bylo lepší na viditelnost jednotlivých buněk. Ve vzorcích a), b) a d) lze vidět poměrně rozsáhlou agregaci buněk. Vzorek c) je zajímavý přítomností velkého množství již zmíněných nečistot. Tyto nečistoty (buněčné komponenty) byly v nepatrné míře pozorovány u všech vzorků. Na základě výsledků získaných prostřednictvím mikroskopu lze předpokládat, že předešlé výsledky získané pomocí techniky DLS byly značně ovlivněny vzájemnou agregací jednotlivých buněk či nečistot.



Obrázek 27: Snímky jednotlivých vzorků z mikroskopu. Jedná se o barvivo nilskou červeň a vzorky jsou zhotoveny zředěním usazeniny jednotlivých suspenzí.

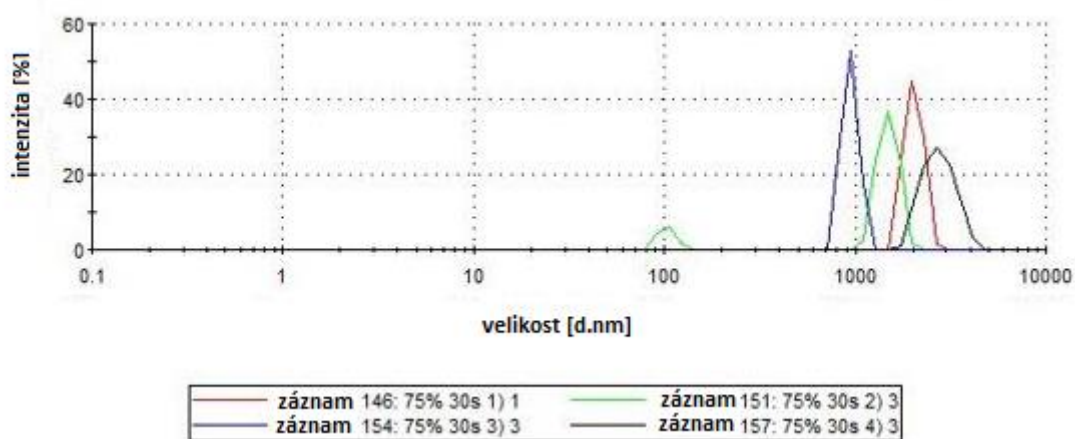
5.3.2 Izolace za použití gradientové centrifugace

Během izolace nativních PHB se pracovalo i s postupem popsaném v kapitole 4.4.1. Tento postup obsahoval centrifugace v hustotním gradientu glycerolu, kdy byly zhotoveny 2 sady vzorků. První sada byla při 75% amplitudě ultrazvuku po dobu 30 sekund a druhá sada byla při stejné amplitudě po dobu 40 sekund. Jednotlivé vzorky (liší se otáčkami, koncentrací glycerolu a opakováním, viz kapitola 4.4.1) vykazovaly velmi odlišný vizuální charakter, což lze vidět na obrázku 28.



Obrázek 28: Vizuální charakter vzorků (1 – 15 ml 100% glycerolu na 6 ml suspenze, 7000 rpm, 4 °C, 20 min; 2 – směs 5 ml 100% glycerolu, 10 ml 50% glycerolu na 10 ml suspenze, 7000 rpm, 4 °C, 20 min; 3 – 15 ml 100% glycerolu na 6 ml suspenze, 7000 rpm, 4 °C, 20 min, následováno promytím 30 ml 50 mM fosfátovým pufrem a celý postup ještě 2× zopakován) po centrifugaci za použití postupu 4.4.1.

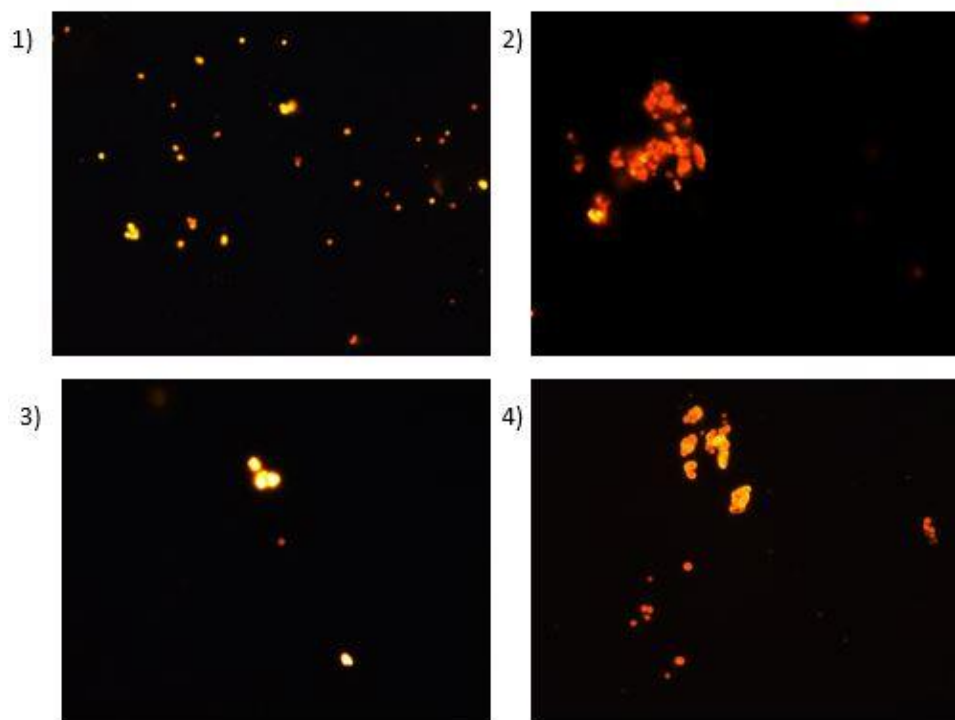
Jako první bylo provedeno měření DLS, které mělo neprokazatelné výsledky, navíc jednotlivá měření, každý vzorek se jako ve všech ostatních měřeních proměřoval 3×, vykazovalo rozdílné výsledky. Za použití glycerolu se neprojevila žádná viditelná změna oproti postupu bez použití glycerolu (popsaném v bodě 4.4). Měření DLS je zobrazeno na obrázku 29.



Obrázek 29: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vzorcích (viz kapitola 4.4.1) při postupu s glycerolem.

Po výsledcích z měření DLS byly vzorky následně pozorovány pod mikroskopem. Z tohoto pozorování však taktéž nebyly patrné výraznější změny oproti postupu bez glycerolu. Pod mikroskopem byl pozorovatelný velký zákal buněčných komponent, který velmi znesnadňoval samotné pozorování. Ve vzorku 1) lze vidět krásně oddělené buňky, oproti tomu ve vzorcích 2) a 4) lze pozorovat agregaci velkého množství buněk. Snímky jsou vidět na obrázku 30. Na

základě výsledků lze usoudit, že využití glycerolu jako stabilizující složky pro amorfní charakter vyžaduje další experimentální optimalizaci.



Obrázek 30: Snímky jednotlivých vzorků z mikroskopu. Postup zahrnoval i centrifugaci v hustotním gradientu s použitím glycerolu. Jedná se o vzorky 75% amplitudy po dobu 30 sekund.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma krystalizace mikrobiálních polyesterů a na základě této rešerše zvolit a otestovat vhodné metody přípravy amorfni formy mikrobiálních polyesterů. Dále také navrhnout a realizovat modelový experiment pro studium kinetiky krystalizace připravených forem polyesterů a na závěr zhodnotit využitelnost navržené experimentální metodiky při diskuzi biologických důsledků krystalizace mikrobiálních polyesterů *in vivo*.

V rámci prvního experimentu byly otestovány jednotlivé měřicí techniky při zkoumání krystalinity suspenze PHB granulí po ultrazvuku pro časovou řadu. Analytická centrifugace se projevila jako velmi účinná metoda k posuzování rychlosti sedimentace a charakteru suspenze. Jako již rutinně využívaná metoda byla pro stanovení velikosti částic použita metoda dynamického rozptylu světla (DLS) a samotná krystalinita se zkoumala pomocí metody FTIR, která v rámci pár vteřin dokáže analyzovat vzorek a vyhodnotit míru krystalinity. Závěrem zkoumání krystalinity pro časovou řadu bylo stanovení ideální doby vystavení vzorku ultrazvuku při 95% amplitudě. Tato doba byla stanovena na rozmezí 60–90 s, jelikož v těchto časech vykazovaly vzorky nejdéle amorfni charakter.

Cílem druhého experimentu bylo pokusit se o izolaci PHB v nativním amorfni stavu. Začátek experimentu navazoval na ten předchozí a pracoval s časy 60 a 90 s. Nicméně po provedení celého postupu izolace PHB granulí se výsledky měření FTIR nijak nezměnily a vzorky stále po vysušení vykazovaly známky krystalizace. Na základě těchto výsledků byla testována závislost amplitudy ultrasonifikace na krystalinitě PHB granulí a využití těchto poznatků pro izolaci. Metoda FTIR vyhodnotila vzorky s nižší amplitudou jako amorfni i určitou dobu po vysušení, nicméně z výsledků DLS bylo patrné, že buňky nebyly rozbité, a tudíž nedošlo k izolaci granulí.

Během závěrečného experimentu byla proměřena časová řada pro 75% amplitudu ultrasonifikace a z ní byl vybrán interval, jenž vykazoval nejlepší výsledky krystalinity. Tento interval byl následně použit pro izolaci a ani tentokrát z výsledků nebylo patrné, že byly buňky zdárně rozbité. Po mikroskopickém pozorování buněk se ukázalo, že ještě spousta bakterií byla ve formě kompletních buněk. Finálním pokusem experimentu byla izolace za použití hustotního gradientu glycerolu při centrifugaci, nicméně výsledky pozdějších měření neukázaly žádné výraznější změny.

Tato práce byla založena na publikaci *Y. Kawaguchiho a Y. Doi (1990)*. Výsledky jejich experimentů se však v našich podmínkách nepodařilo zopakovat. Na základě výsledků této práce by pro izolaci nativních amorfni PHB granulí mohla být v příštím experimentu pro narušení buněk použita jiná metoda než ultrasonifikace, například French press, nebo narušení buněk pomocí skleněných kuliček. Na závěr zbývá poznamenat, že pro charakterizaci PHB granulí se ukázaly být zvolené metody velmi vhodné a dá se tedy předpokládat, že se tyto testované techniky stanou cenným metodickým aparátem v navazujících experimentech, zaměřených na studium PHB granulí a dalších pokusů o izolaci nativního amorfniho polymeru PHB.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHAITANYA, K, S.K MAHMOOD, Rana KAUSAR a N SUNILKUMAR. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates by Various Isolates: A Review. International Journal of Pharmaceutical Science Invention. 2014, 11. ISSN 2319 – 6718.
- [2] CRAMM, Rainer. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2009, 16(1-2), 38-52. DOI: 10.1159/000142893. ISSN 1660-2412. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/142893>
- [3] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. Scientific Reports. 2016, 6(1). DOI: 10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep26612>
- [4] TAN, Giin-Yu, Chia-Lung CHEN, Ling LI, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. Polymers. 2014, 6(3), 706-754. DOI: 10.3390/polym6030706. ISSN 2073-4360. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/6/3/706>
- [5] SUDESH, K, H ABE, Y DOI, et al. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [6] SINGH, Akhilesh Kumar a Nirupama MALLICK. SCL-LCL-PHA copolymer production by a local isolate, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. Biotechnology Journal. 2009, 4(5), 703-711. DOI: 10.1002/biot.200800307. ISSN 18606768. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200800307>
- [7] PHILIP, S., T. KESHAVARZ, I. ROY, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. Journal of Applied Microbiology. 2007, 82(3), 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [8] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Applied Microbiology. 2007, 102(6), 1437-1449. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- [9] CHVÁTAL, Marek. Úvod do mineralogické krystalografie. Chrudim: Vodní zdroje Chrudim, 2013. ISBN 978-80-905154-7-5.

- [10]SILBERBERG, Martin S. a Elizabeth Bent WEBER. Chemistry: the molecular nature of matter and change. 5th ed. Boston: McGraw-Hill, c2009. ISBN 978-0077216504.
- [11]NUMATA, Keiji, Hideki ABE a Tadahisa IWATA. Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials. *Materials*. 2009, 2(3), 1104-1126. DOI: 10.3390/ma2031104. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/3/1104>
- [12]PROKOPOVÁ, Irena. Makromolekulární chemie. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-662-3.
- [13]LEDNICKÝ, František. Mikroskopie a morfologie polymerů. Vyd. 2., přeprac. V Liberci: Technická univerzita, 2009. ISBN 978-80-7372-486-3.
- [14]Fernández, Carlos. (2010). Crystallization and Structure of Microbial Polyesters, Carbohydrate-Based Polyamides and n-Polyurethanes.
- [15]WADHWA, Sham K., Tasneem Gul KAZI, Mustafa TUZEN, Hassan Imran AFRIDI, Naeemullah BRAHMAN a Kapil Dev BRAHMAN. Application of Polyhydroxybutyrate-polyethyleneglycol (a block co-polymer) for Solid Phase Extraction of Lead and Copper in Different Food Samples. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 2014, 15(No. 1), 66 – 73. ISSN 1996-918X.
- [16]BARKER, P.A., P.J. BARHAM a J. MARTINEZ-SALAZAR. Effect of crystallization temperature on the cocrystallization of hydroxybutyrate/ hydroxyvalerate copolymers. *Polymer*. Elsevier Science, 1997, Vol.38(No.4), 913-919. ISSN 032-386.
- [17]SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Vojtech ENEV, et al. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(4), 1905-1917. DOI: 10.1007/s00253-018-09584-z. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-09584-z>
- [18]JACQUEL, Nicolas, Chi-Wei LO, Yu-Hong WEI, Ho-Shing WU a Shaw S. WANG. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*. 2008, 39(1), 15-27. DOI: 10.1016/j.bej.2007.11.029. ISSN 1369703X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X07004433>
- [19]TERADA, Mikio, R.H. MARCHESSAULT, Yu-Hong WEI, Ho-Shing WU a Shaw S. WANG. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999, 25(1-3), 207-215. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00036-7. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813099000367>

- [20]JIANG, Xuan, Juliana A. RAMSAY, Bruce A. RAMSAY, Ho-Shing WU a Shaw S. WANG. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, 67(2), 212-219. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.03.015. ISSN 01677012. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701206000856>
- [21]PENG, Yu-Chiang, Chi-Wei LO, Ho-Shing WU, Ho-Shing WU a Shaw S. WANG. The isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1-blue using the digestion method. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2013, 91(1), 77-83. DOI: 10.1002/cjce.20685. ISSN 00084034. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cjce.20685>
- [22]KAPRITCHKOFF, Fernanda M., Alexandre P. VIOTTI, Rita C.P. ALLI, et al. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*. 2006, 122(4), 453-462. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.09.009. ISSN 01681656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816560500619X>
- [23]DE KONING, G. J. M., B. WITHOLT, Rita C.P. ALLI, et al. A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads* Part 1: Solubilization. *Bioprocess Engineering*. 2006, 17(1), 453-462. DOI: 10.1007/s004490050345. ISSN 0178515X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s004490050345>
- [24]KAWAGUCHI, Yasushi, Yoshiharu DOI, Rita C.P. ALLI, et al. Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules characterized by X-ray diffraction: Solubilization. *FEMS Microbiology Letters*. 1990, 70(2), 151-156. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb13969.x. ISSN 03781097. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1990.tb13969.x>
- [25]GEBAUER, B. a D. JENDROSSEK. Assay of Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase Activity and Product Determination. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72(9), 6094-6100. DOI: 10.1128/AEM.01184-06. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01184-06>
- [26]PORTER, Michael a Jian YU. Monitoring the in situ crystallization of native biopolyester granules in *Ralstonia eutropha* via infrared spectroscopy: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool held in Stockholm, 10-16 june, 1998. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, 1999, 87(1), 49-55. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.07.009. ISSN 01677012. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701211002594>

- [27] MARTINO, Lucrezia, et al. Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator* cells grown on used cooking oil. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, 71, 117-123. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.016. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002438>
- [28] LAUZIER, C., J.-F. REVOL a R.H. MARCHESSAULT. Topotactic crystallization of isolated poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992, 103(2-4), 299-310. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05851.x. ISSN 03781097. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05851.x>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA – polyhydroxyalkanoáty (3HA)

PHB – polyhydroxybutyráty (3HB)

DLS – dynamický rozptyl světla

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

scl-PHA – short-chain-length PHA

mcl-PHA – medium-chain-length PHA

lcl-PHA – long-chain-length PHA

P3HB – poly-3-hydroxybutyrát

P4HB – poly-4-hydroxybutyrát

P3HBV – poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

3HV – 3-hydroxyvalerát

3HHD – 3-hydroxyhexadekanoát

3HOD – 3-hydroxyoktadekanoát

SDS – dodecylsírán sodný

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

dPHB – denaturované PHB

nPHB – nativní PHB

HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie

ATR – zeslabený úplný odraz

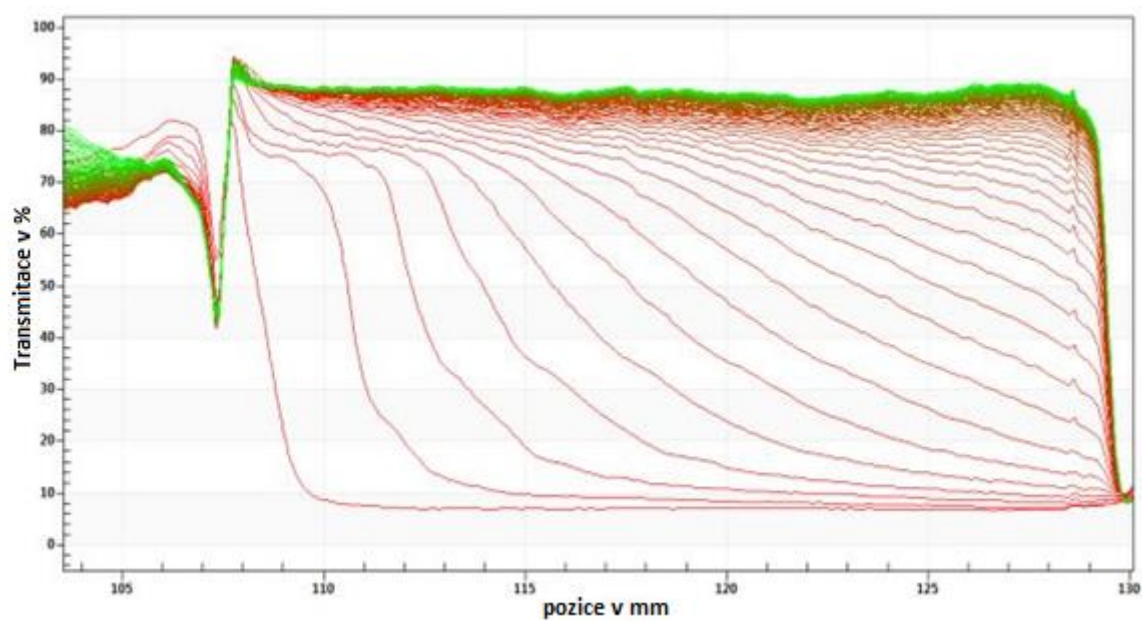
DSC – diferenční skenovací kalorimetrie

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

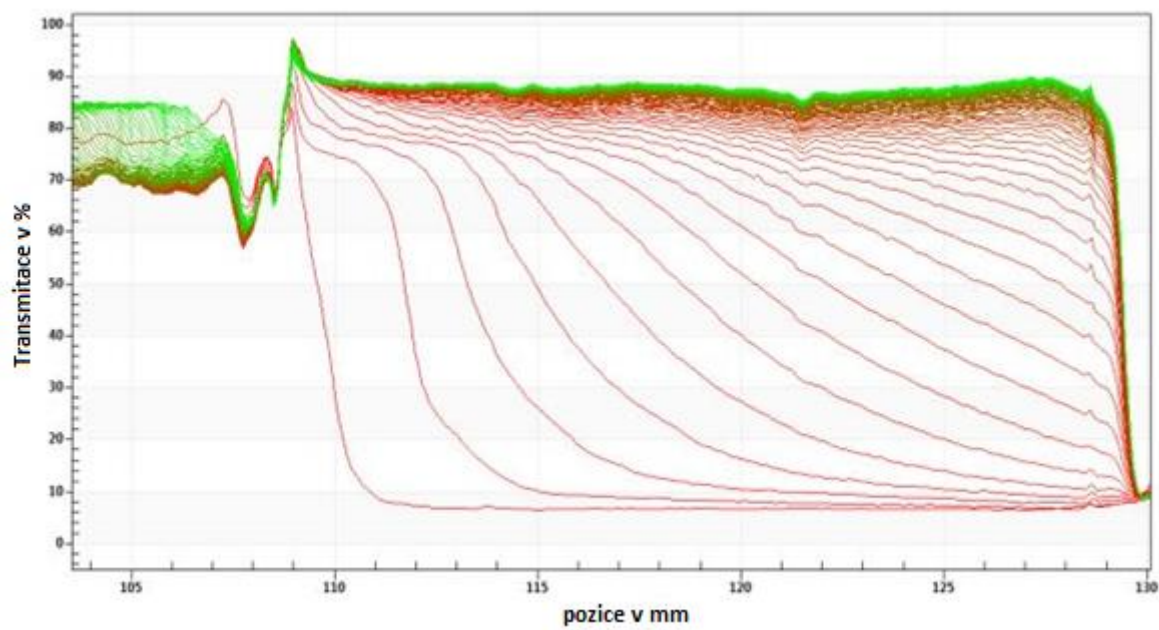
NB – Nutrient Broth

DMSO – Dimethylsulfoxid

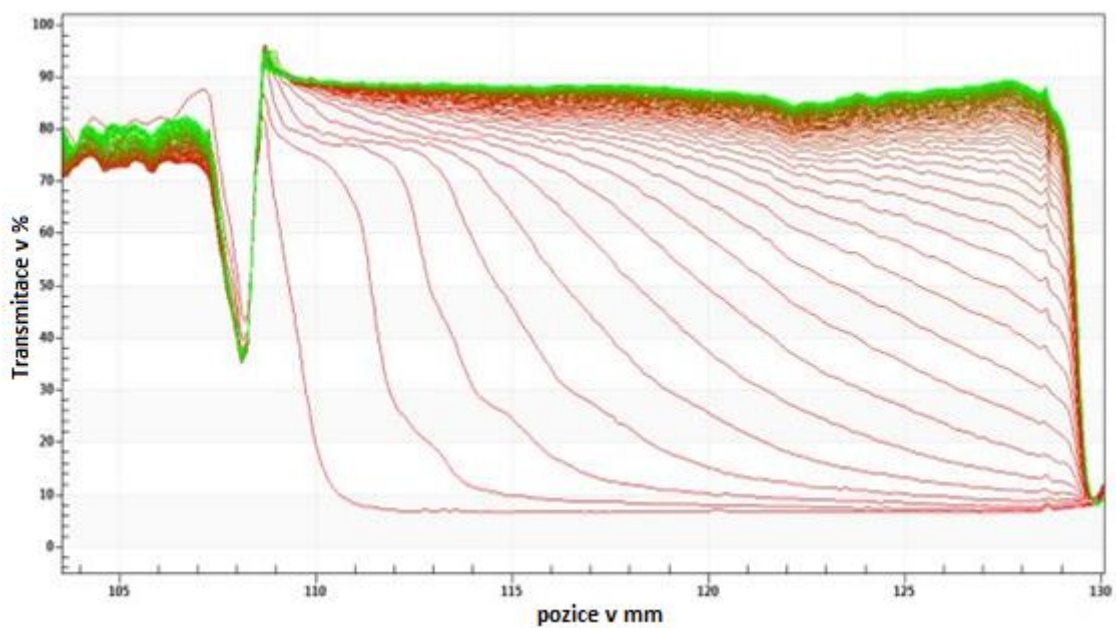
9 PŘÍLOHY



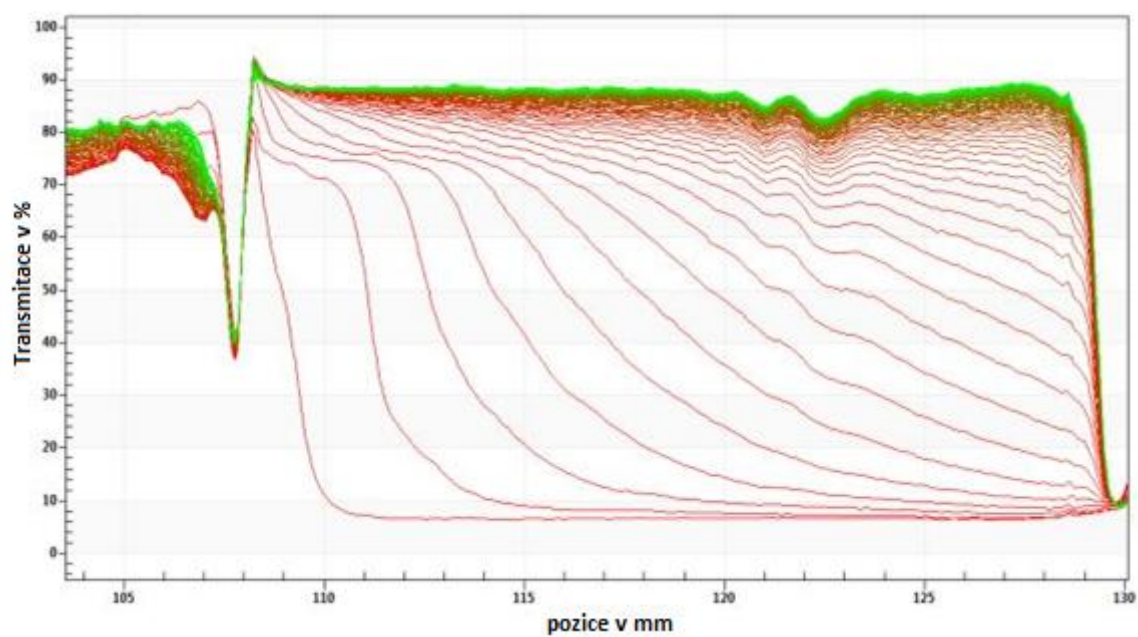
Obrázek 31: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 60 s.



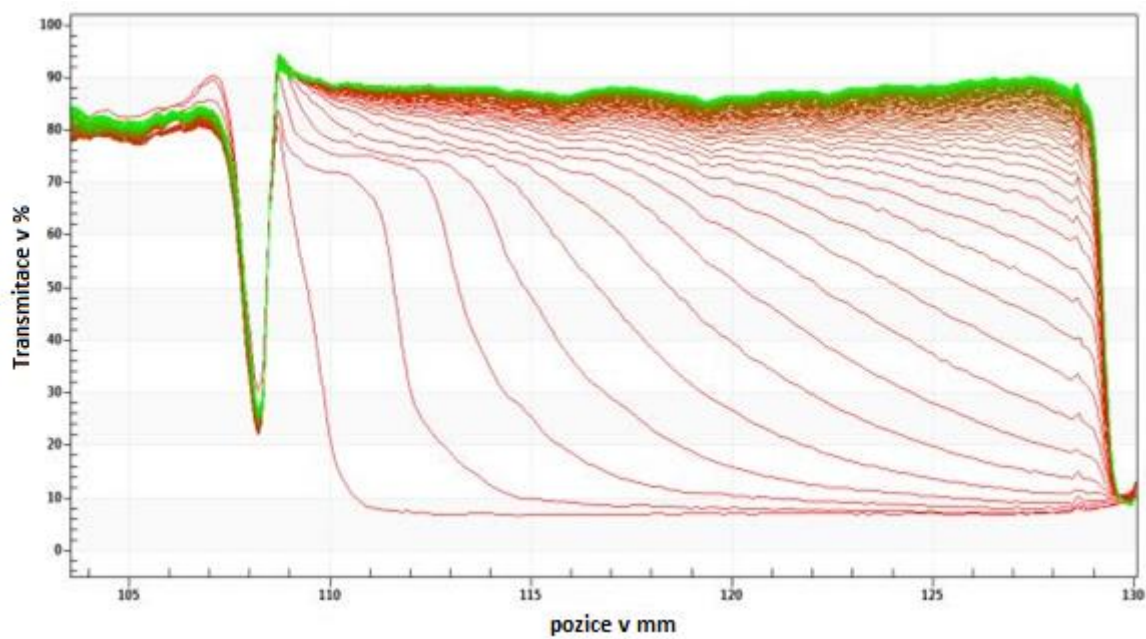
Obrázek 32: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 90 s.



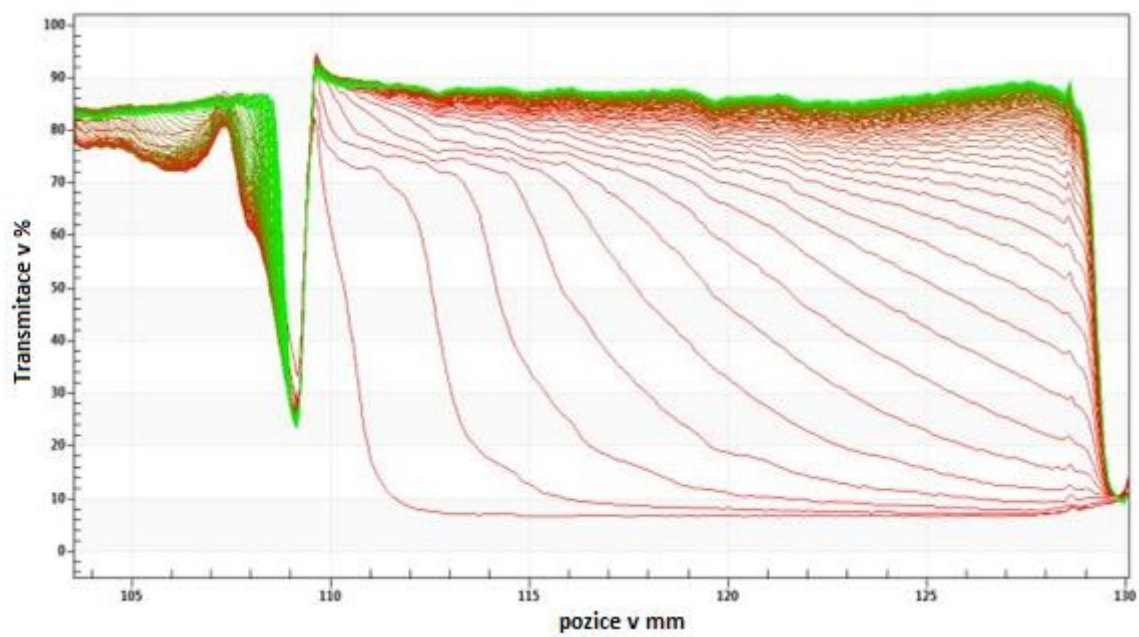
Obrázek 33: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 120 s.



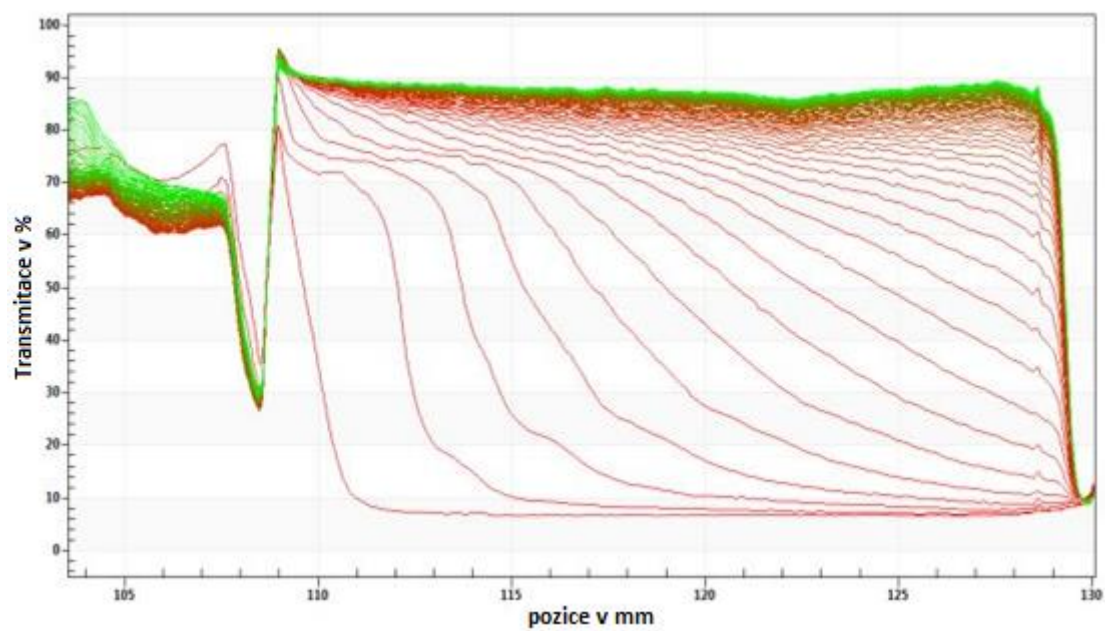
Obrázek 34: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 150 s.



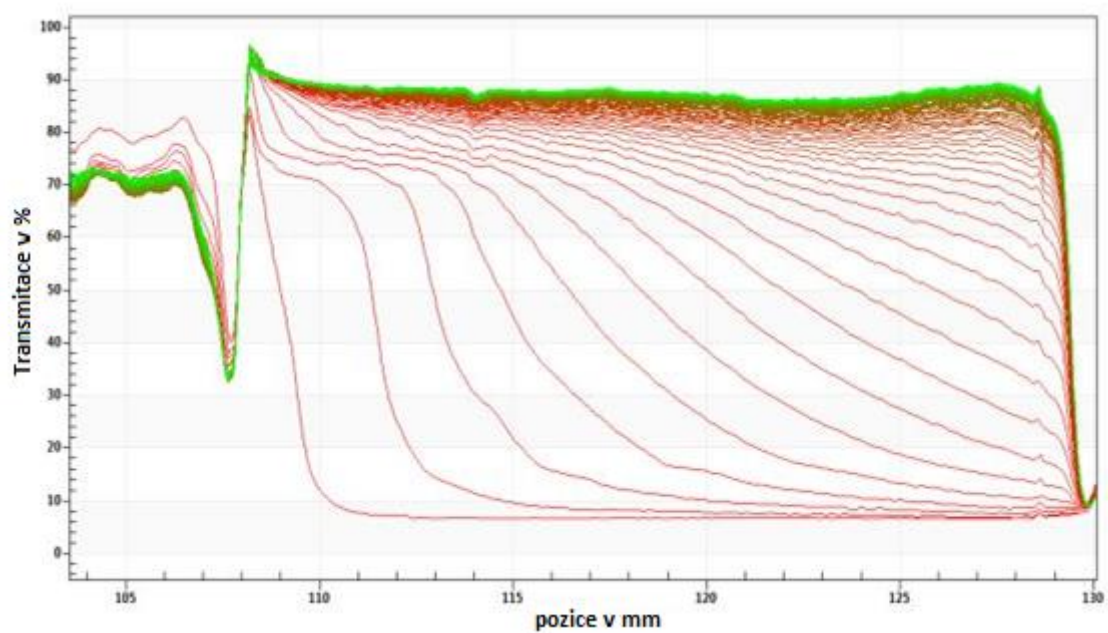
Obrázek 35: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 180 s.



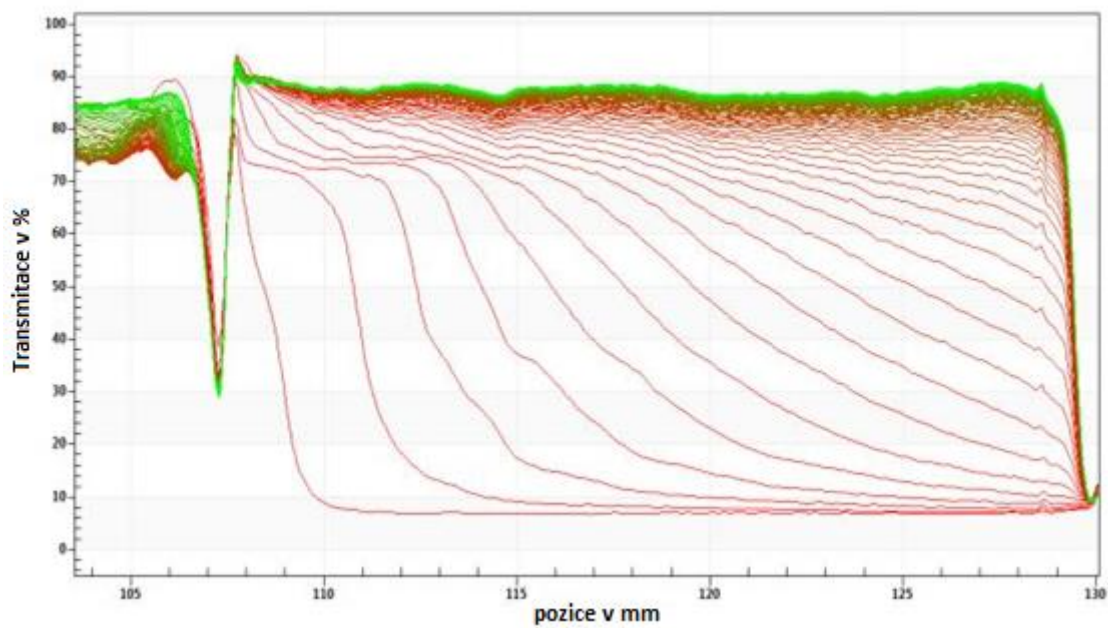
Obrázek 36: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 210 s.



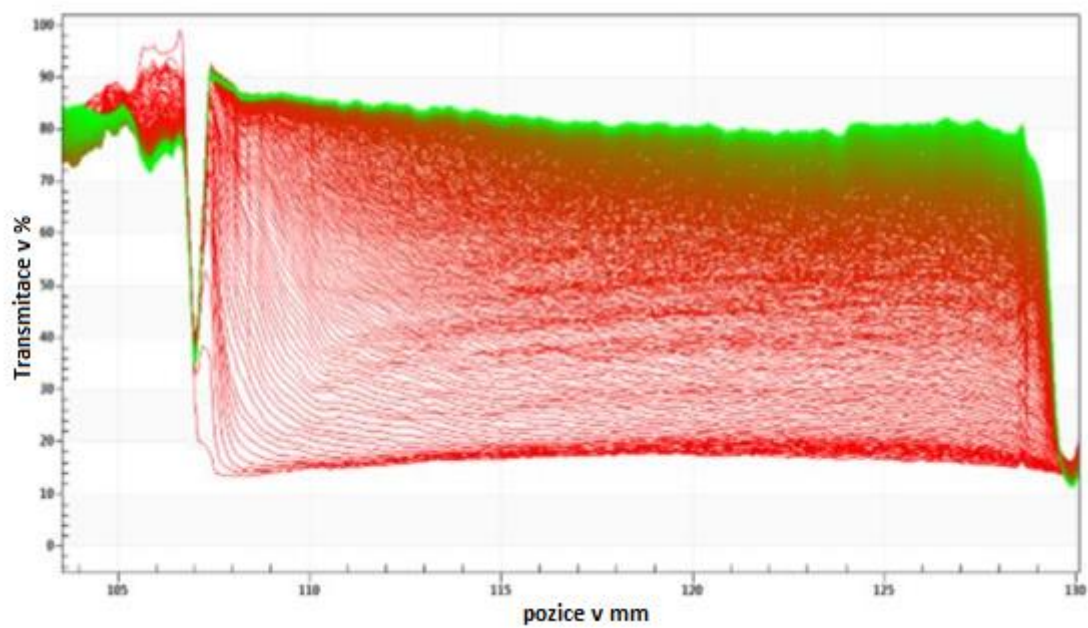
Obrázek 37: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 240 s.



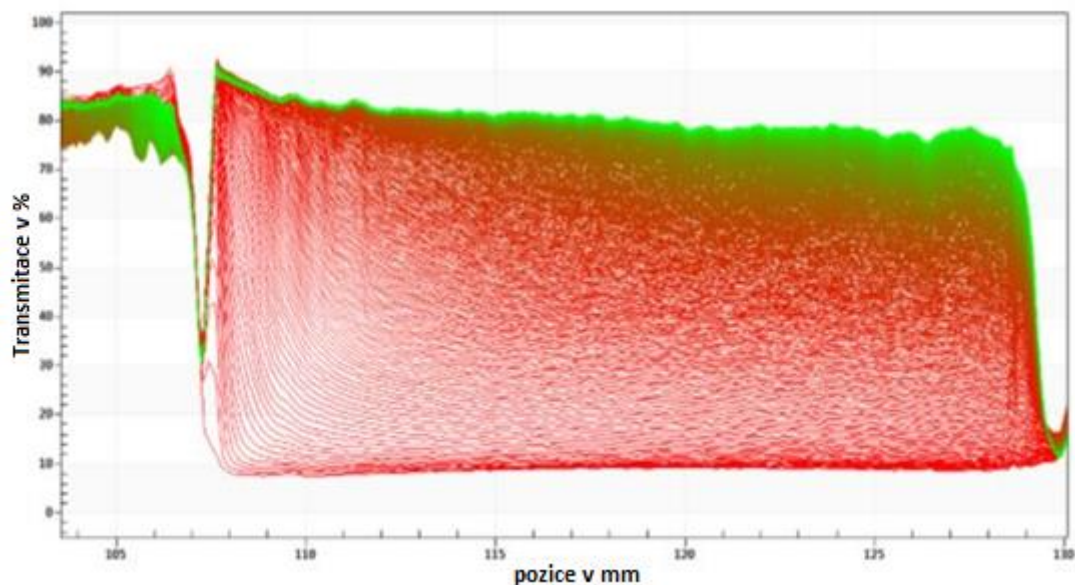
Obrázek 38: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 300 s.



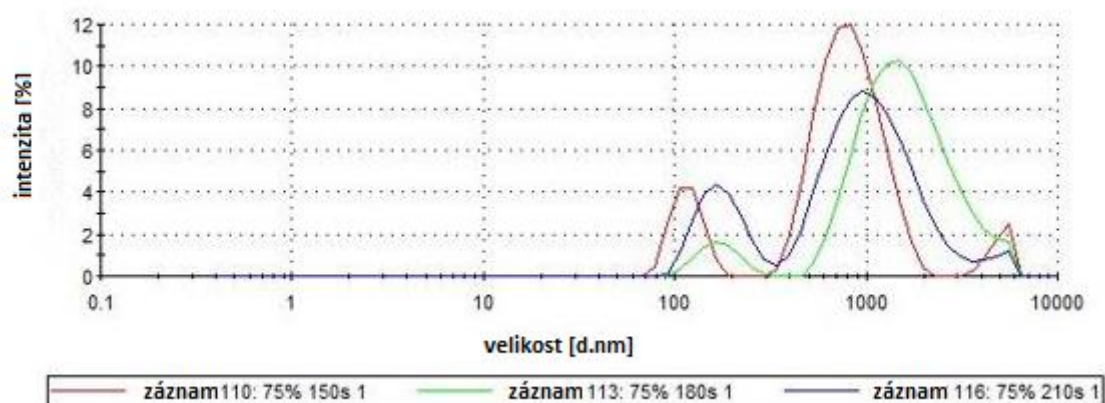
Obrázek 39: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 95 % 360 s.



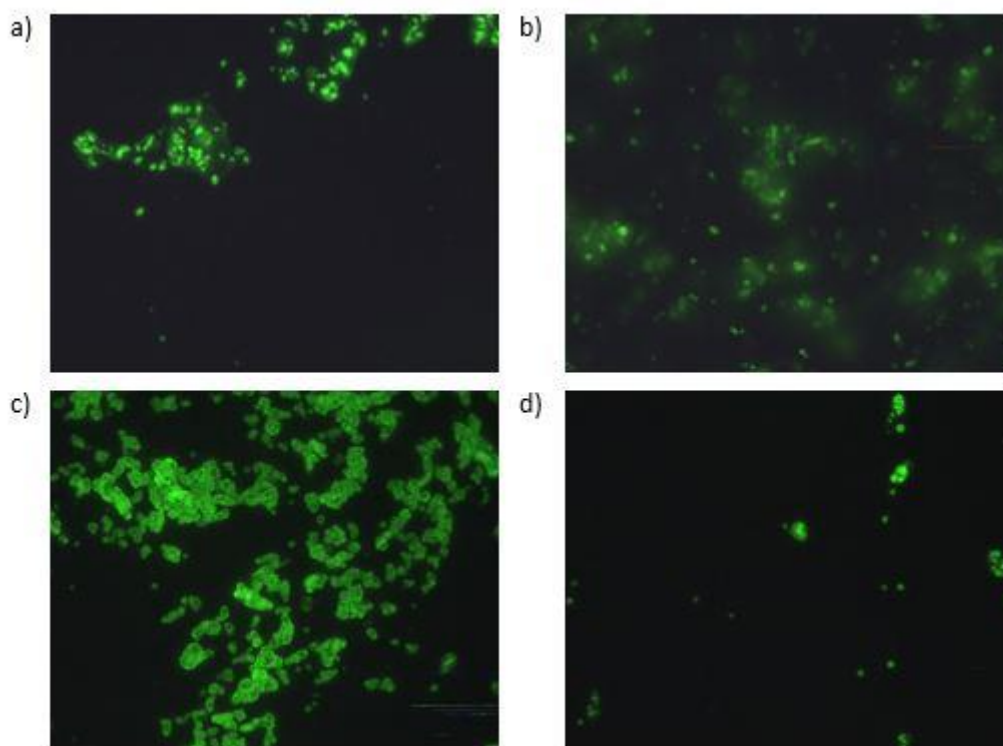
Obrázek 40: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 85 % 67 s. Vybraná data z měření v experimentu 2.



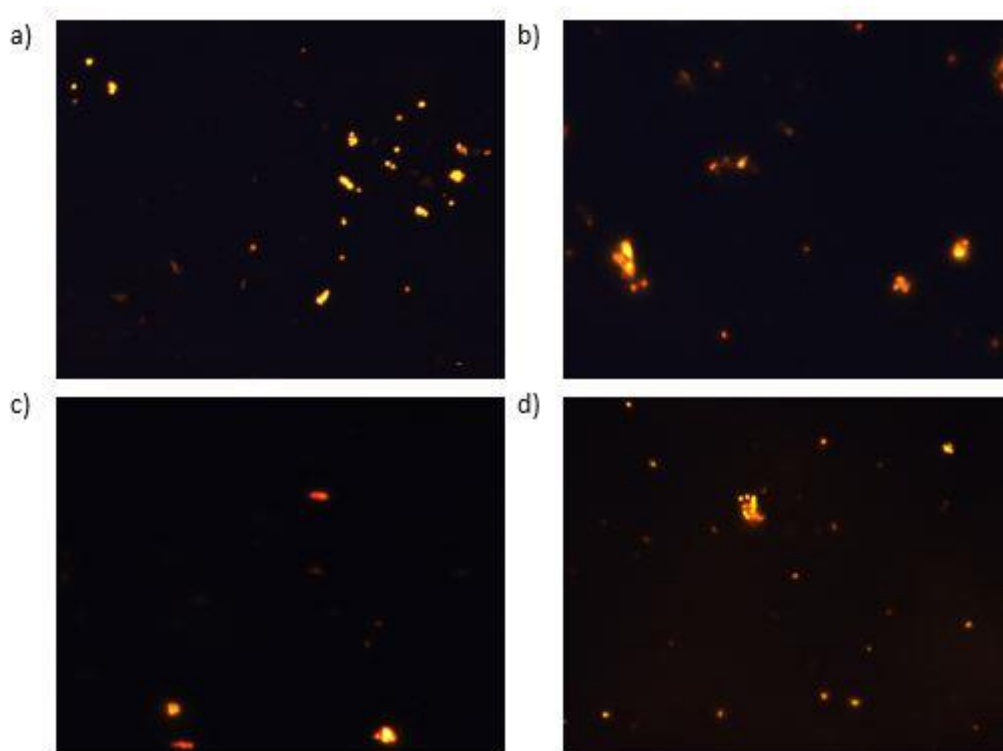
Obrázek 41: Výsledky sedimentační analýzy pro vzorek 50 % 171 s. Vybraná data z měření v experimentu 2.



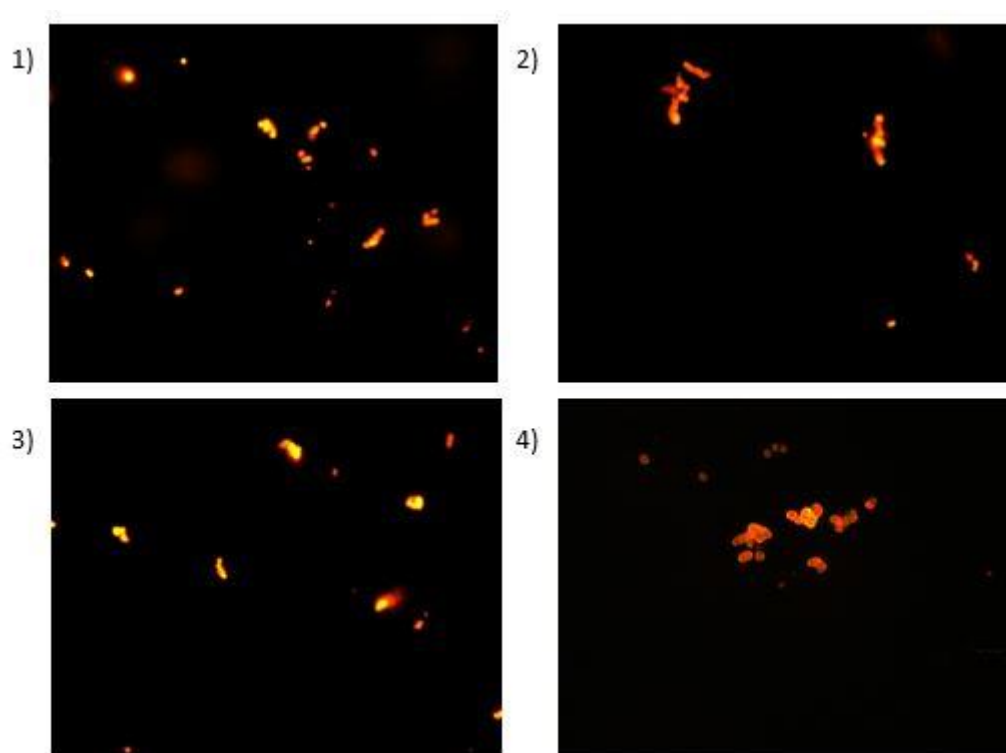
Obrázek 42: Srovnání distribucí velikostí jednotlivých částic ve vybraných vzorcích (červená – 75% 150 s; zelená – 75% 180 s; modrá – 75% 210 s). Měření DLS bylo provedeno ihned po ukončení ultrasonifikace. Jedná se o zbylé vzorky z experimentu 3 kapitoly 5.3.1.



Obrázek 43: Snímky jednotlivých vzorků z mikroskopu. Jedná se o barvivo BODIPY a vzorky jsou zhotoveny zředěním usazeniny jednotlivých suspenzí. Experiment 3 kapitola 5.3.1.



Obrázek 44: Snímky jednotlivých vzorků z mikroskopu. Jedná se o barvivo nilskou červeň a vzorky jsou zhotoveny z roztoku nad usazeninou jednotlivých suspenzí. Experiment 3 kapitola 5.3.1.



Obrázek 45: Snímky jednotlivých vzorků z mikroskopu. Postup obsahoval použití glycerolu. Jedná se o vzorky 75% amplitudy po dobu 40 sekund. Experiment 3 kapitola 5.3.2.